Untersuchungen über Membranoberflächen- und Extrazellulärmatrixproteine im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Embryogenese der retino- tectalen Projektion beim Hühnchen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Ysander v. Boxberg

aus Dresden

1987

UNIV.
LIBRARY
KIEL

Untersuchungen über Membranoberflächen- und Extrazellulärmatrixproteine im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Embryogenese der retino- tectalen Projektion beim Hühnchen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Ysander v. Boxberg

aus Dresden

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 27. August 1987
Dekan: Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Schwarz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG 5

EINLEITUNG 6

KAPITEL I: Gelelektrophoretische Analyse und Isolierung von Membranoberflächen- und Extracellulärmatrix- Proteinen mit Hilfe einer Markierung mit Biotin- Estern 12

- Einführung 12
- Auswahl eines geeigneten Biotinesters 15
- Reaktionsbedingungen für die Markierung von Zellen mit Biotin-X-NHS 16
- Untersuchungen von biotinyl. Proben mit dem Lichtmikroskop 18
- Untersuchungen von biotinyl. Proben mit dem TEM 21
- in vitro-Explantate von Biotin- markierten Retinae 24
- Gelelektrophoretische Auftrennung von Biotin-markierten Proben 25
- Nachweisempfindlichkeit der Biotinmarkierung auf Gelen 27
- Anwendungsbeispiele für die Biotinmarkierung mit anschließender 2D- Gelelektrophorese 28

  a) Vergleich der Oberflächen- und Matrixprotein- Markierung mit dem Gesamtproteinmuster des Tectums 28
  b) Vergleich des Oberflächenproteinmusters des Tectums in verschiedenen Entwicklungsstadien 30
  c) Vergleich des Oberflächenproteinmusters von nasalen und temporalen retinalen Axonen 30

- Vergleich zwischen der Oberflächenmarkierung mit Biotin-X-NHS und mit Maleimido-Butyryl-Biocytin 33
- Affinitätschromatographie der biotinylierten Zelloberflächen-und Matrixproteine an Avidin-Agarose 36
- Ausbeute und Anreicherungsfaktor der Affinitätschromatographie 40

KAPITEL II: Fraktionierung von Tectum-Membranen und Test der erhaltenen Vesikel auf Adhäsivität an retinale Axone in vitro 41

- Einführung 41

- Entwicklung einer neuen Präparationsmethode für Membranvesikel 42

- Bestimmung des Anreicherungsfaktors der Membranproteine 45

- Adhäsion der Rohvesikel an retinale Axone auf Collagen 45

- Kontrollversuch: Bindung von Rohvesikeln aus Vorderhirn an Retina- Neurite 45

- Bindung von Rohvesikeln aus Tectum an retinale Axone auf Laminin 47

- Fraktionierung der Rohvesikel über präparative Elektrofokussierung 49

- Durchführung der präparativen Elektrofokussierung 51

- Adhäsion der verschiedenen Vesikelfraktionen an retinale Axone 53

- Elektrophoretische Analyse der verschiedenen Vesikelfraktionen 56

DISKUSSION 60

ANHANG 68

- MATERIAL UND METHODEN 68

A) Zellkultur
1. Versuchstiere: Hühner 68
2. Seren und Medien für die Zellkultur 68
3. Präparation von Retinae und Tecta 68
4. Herstellung von Retina-Explantaten 69

B) Histologische Techniken
5. Herstellung von Gewebeschnitten für die Licht- und Elektronenmikroskopie 70

C) Gelektrophorese und Blotting
6. Ein- und zweidimensionale Elektrophorese im Mikromaßstab 71

D) Markierung von Geweben und Zellen mit Biotin und Affinitätschromatographie der biotin. Moleküle
7. Biotinylierung von Geweben und Zellen 72
8. Affinitätschromatographie von biotinylierten Membranproteinen an Avidin-Agarose 73
9. Dot-Blot-Verfahren zur Überwachung der Säulen-Elution 74

E) Membranvesikel
10. Präparative Fokussierung der Membran-Rohvesikel 75
11. Herstellung von Lecithin-Vesikeln aus der an Lipid-Vesikeln freien flüsigen Phase 76

F) Allgemeines
12. Silikonisierung von Glaswaren 77
13. PBS 77
14. Chemikalien 77
15. Geräte für die Licht- und Elektronenmikroskopie 77

G) Abkürzungen 78

- LITERATURVERZEICHNIS 79

- DANK 87

- LEBENSLAUF 88

ZUSAMMENFASSUNG

Für eine biochemische Analyse und Isolierung von Zelloberflächen- und Extrazellulärmatrixproteinen wurde die Methode der Markierung mit aktivierten Biotin-Estern entwickelt.

Weiterhin wird eine einfache Möglichkeit beschrieben, Zellmembranen zu isolieren und weiter zu fraktionieren. In daraus rekonstituierten Vesikeln behalten adhäsive Proteine ihre Aktivität.

Beide Methoden wurden für die Untersuchung der Embryogenese der retino-tectalen Projektion beim Hühnchen angewendet und diskutiert.

In kaum einem anderen Forschungsgebiet der modernen Biologie scheinen experimentelle Fortschritte ähnlich schwer zu erzielen wie bei der Untersuchung der Embryogenese des Zentralnervensystems (ZNS). So faszinierend die Komplexität des ZNS und der für seine Funktion notwendige hohe Ordnungsgrad innerhalb seiner Komponenten sind, so kann sie aber auch gleichzeitig der Grund sein für die schwierige experimentelle Zugänglichkeit: Bei *in vitro*- Experimenten an isolierten Komponenten, wie sie heute die hauptsächlich histologisch- beschreibenden Untersuchungen der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts abgelöst haben, wird jeweils nur der Einfluß eines einzigen oder doch weniger Parameter auf das Gesamtsystem betrachtet: je komplexer das System, desto schwieriger ist es, aus solchen Experimenten überhaupt Rückschlüsse ziehen zu können.
Seit Ende des vorigen Jahrhunderts und den bahnbrechenden Untersuchungen von Cajal (Cajal, 1890; 1910), His (His, 1894) u.a. wird über die Frage nachgedacht, wie im Laufe der Embryogenese wachsende Nervenfasern den Weg in ihr Zielgebiet finden und dort die richtigen Verschaltungen ausbilden. Für das periphere Nervensystem existieren heute bereits relativ genaue und experimentell untermauerte Vorstellungen. Die Entdeckung der Pionier-Neurone führte zur Formulierung der "labeled pathway"-Hypothese (Bastiani *et al.*, 1985); Arbeiten über die Bedeutung der extrazellulären Matrix (McMahon *et al.*, 1983)) und bestimmter wachstumsstimulierender Substanzen wie Nervenwachstumsfaktor (NGF) (Levi- Montalcini und Hamburger, 1953; Gundersen, 1985) für das Auswachsen und die

Zielfindung der Axone rundeten das Bild ab. Schließlich scheint Kompetition zwischen einzelnen Nervenendigungen bei der Etablierung des endgültigen Innervationsmusters (Purves, 1983) eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Hinblick auf die Embryogenese des ZNS ist besonders die Entwicklung der retinotectalen Projektion bei Fischen, Amphibien und Vögeln gut untersucht worden. Retinale Axone wachsen über den optischen Nerv, das Chiasma und den optischen Trakt bei diesen drei Tierklassen in das Tectum opticum ein und bilden dort eine sogenannte retinotope Projektion aus: Benachbarte Axone aus einem bestimmten Gebiet der Retina haben auch benachbarte Terminationspunkte im Tectum; das zweidimensionale Abbild der Umwelt auf der Netzhaut wird so, topologisch weitgehend unverändert, wenn auch für beide Achsen spiegelverkehrt, auf die Oberfläche des Tectums projiziert.

Wie eine dermaßen präzise Verschaltung zustandekommen kann, darüber gehen die Meinungen weit auseinander. Seit den ersten Zellkulturexperimenten von Harrison (Harrison, 1910) ist bekannt, daß wachsende Axone mit ihrem distalen Ende, dem Wachstumskegel ("growth cone"), die Umgebung absuchen können. Als Leitstrukturen auf ihrem Weg vom Entstehungsort (hier Retina) zum Ziel (hier im Tectum) könnten mechanische (Weiss, 1934) sowie chemische (Sperry, 1943) Substrate dienen - mechanische z.B. in Form kanälchenartiger, von Gliazellen gebildeter Hohlräume (Silver und Sidman, 1980; Krayanek und Goldberg, 1981), oder speziell organisierter Extrazellulärmatrix; eine bevorzugte Wachstumsrichtung kann sich dabei eventuell durch eine gradiert zunehmende Adhäsivität der Fasern an das Substrat ergeben (Letourneau, 1975 a,b). Auch

mechanischer Stress kann in vitro eine Nervenfaser dirigieren (Bray, 1984).

Chemische Leitsignale könnten vorliegen als Marker-Moleküle auf den Axonen und im Tectum; eine dementsprechende" Chemoaffinitäts-Theorie" wurde vor allem von Sperry propagiert (Sperry, 1963) und wird heute, in abgewandelter Form, bei der gegenläufige chemische Gradienten für die Wegfindung verantwortlich wären (Frazer, 1980; Gierer, 1981), vielfach favorisiert. Die Ordnung der Fasern im optischen Nerv sowie beim Einwachsen ins Tectum spielt möglicherweise eine Rolle, ebenso wie zeitliche Faktoren (Rager, 1980); auch eine Galvanotropismus-Theorie wird diskutiert (Ariens- Kappers, 1917; Patel et al., 1985). Sicher ist, daß sich nach der ersten, mehr oder weniger grob-retinotopen Innervierung des Tectums eine Feinregulation der Verschaltung anschließt, wobei wahrscheinlich mittelbar die elektrische Spontanaktivität der Axone und der Zelltod einzelner Neurone eine Rolle spielen (Changeux und Danchin, 1976).

Für keine der - oben ohnehin nur unvollständig aufgeführten - Theorien hat sich bis heute ein endgültiger Beweis finden lassen. Da es vielmehr aus experimentellen Daten Hinweise auf die Beteiligung mehrerer Mechanismen an der axonalen Wegfindung gibt, setzt sich immer mehr ein eklektizistischer Ansatz durch (Changeux und Danchin, 1976; Bonhoeffer und Gierer, 1984). Für die Zukunft wäre es sinnvoll, genauer zu untersuchen, wie exakt oder diffus eigentlich die allererste Innervierung des Tectums vor sich geht, das heißt z.B., wie groß der Bereich ist, den ein einzelnes "Axonbäumchen" abdeckt, bevor es nach Abschluß der Synaptogenese zum Rückzug

UNIV. LIBRARY

der Kollateralen kommt. Die elektrische Aktivität der Neurone während der Wachstums- bzw. Regenerationsphase kann z.B. mittels Tetrodotoxin-Gaben blockiert werden. Damit könnte der Anteil verschiedener Mechanismen an der Präzision der Verschaltung abgeschätzt werden.

Der Vielfalt an Theorien und Hypothesen zum axonalen Wachstum steht derzeit, zumindest beim Hühnchenembryo, nur eine relativ begrenzte Zahl von Untersuchungsmethoden gegenüber. Da ist erstens die sozusagen "klassische" Histologie mit Licht- und Elektronenmikroskop zu nennen, deren Möglichkeiten auch heute noch nicht voll ausgeschöpft sind, zumal jetzt verschiedenste, auch lokal applizierbare "Tracer"- Substanzen zur Verfügung stehen (Fujisawa, 1981; Thanos, 1983), die von Axonen anterograd oder retrograd transportiert werden.

Große Hoffnungen wurden vor allem in die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gesetzt (Köhler und Milstein, 1975), mit deren Hilfe sich interessante, an der Zielfindung der Axone beteiligte Moleküle aufspüren lassen sollten. Auf diesem Gebiet ist in letzter Zeit einiger Fortschritt erzielt worden, sowohl durch eine gezielte Immunisierung mit hoch- angereichertem Antigen (Henke- Fahle und Bonhoeffer, 1983; Niehörster et al., in Vorbereitung), als auch aufgrund der Tatsache, daß direkt nach bestimmten Klassen von Molekülen gesucht werden konnte, wie z.B. Adhäsionsmolekülen (siehe z.B. Rathjen et al., 1987), die untereinander teilweise Analogien aufweisen.

In einer dritten Art von Experimenten - oft als Entscheidungsversuche ausgeführt - werden verschiedenste Materialien geprüft auf ihre Adhäsivität bzw. ihre Eignung als Wachstumssubstrat für Axone (zwei verschiedene Eigenschaften eines Substrats, die möglicherweise, aber nicht unbedingt auf die gleichen Moleküle zurückzuführen sind). Dafür kommen z. B. in Frage Komponenten der Extrazellulärmatrix, Zellrasen, Zellmembranpräparationen, oder wiederum Axone selbst (Beispiele : Kern-Veits, 1985; Rathjen et al., 1987).

Diese drei Methoden können natürlich auch untereinander kombiniert werden, z. B. bei immunhistologischen Färbungen, oder bei Versuchen, axonales Wachstum auf bestimmten Unterlagen mit Antikörpern zu beeinflussen.
Zu erwähnen sind schließlich noch operative Techniken wie die Transplantation, die Rotation und Entfernung von Ausgangs- oder Zielgewebe der Axone.So hatte z. B. Sperry Hinweise auf ein mögliches Vorhandensein chemischer Marker gewonnen (Sperry, 1943). Diese Arbeiten sind jedoch mit wenigen Ausnahmen an Tierarten durchgeführt worden, bei denen auch die Axone des ZNS regenerieren können, was für Vögel und Säugetiere nicht zutrifft.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung der retino-tectalen Projektion beim Hühnchenembryo. Ausgehend von der Überlegung, daß wachsende Axone in vivo auf jeden Fall membranständige oder extrazelluläre Strukturen als Substrat benutzen und so möglicherweise auch dirigierende Signale erhalten, wurde mit einer biochemischen Charakterisierung der Gesamtheit aller eventuell beteiligten Zelloberflächenmoleküle begonnen. Dazu wurde eine Methode entwickelt, derartige Moleküle spezifisch mit aktivierten Biotin-Estern zu markieren, für die sich auch außerhalb des hier bearbeiteten Themas ein breiter Anwendungsbereich denken läßt.

In einer hiervon unabhängigen Serie von Experimenten, die frühere Arbeiten von W. Halfter (Halfter et al., 1981) zur Grundlage hat, wurden Plasmamembranen des Tectums, also des Zielgewebes retinaler Axone, mit biochemischen Methoden in Fraktionen zerlegt, und die resultierenden Membranvesikel auf ihre spezifische Adhäsivität für retinale Neurite in Kultur geprüft.

Für das Verständnis der Gliederung der Arbeit sei folgendes vorausgeschickt: Da die Erarbeitung neuer, vielfältig anwendbarer Methoden einen breiten Raum einnimmt, wurden rein methodische Gesichtspunkte mit ihrer Beschreibung auch zugleich diskutiert. In dieser Hinsicht fallen also Ergebnis- und Diskussionsteil zusammen. Die gezielte Anwendung der beschriebenen Methoden für die Untersuchung der Embryogenese der retino-tectalen Projektion wird dagegen in einem gesonderten Kapitel diskutiert.

KAPITEL I

Gelelektrophoretische Analyse und Isolierung von Membranoberflächen- und Extrazellulärmatrix-Proteinen mit Hilfe einer Markierung mit Biotin-Estern

Einführung

Für eine allgemeine biochemische Analyse von Zelloberflächenmolekülen und Proteinen der Extrazellulärmatrix müssen die zu untersuchenden Gewebe oder Zellsuspensionen zunächst mit einem spezifischen Protein- Markierungsreagenz umgesetzt werden; daran sollte sich dann z.B. eine ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese anschließen. Für diesen Zweck verwendete Liganden dürfen unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Zellmembran nicht durchdringen, sollten aber dennoch möglichst klein sein, um das Molekulargewicht der markierten Moleküle nicht wesentlich zu erhöhen.
Die bis heute am häufigsten angewandte Methode war die Jodierung von Zelloberflächenmolekülen in der relativ schonenden Variante nach Bolton und Hunter (siehe z.B. Pinder et al., 1978). Vor allem für zweidimensionale Gele, wie sie für eine genauere Analyse unerläßlich sind, schien uns jedoch die Jodmarkierung nur eine relativ schlechte Auflösung zu bieten (persönl. Beobachtung). Daneben macht eine Markierung nach Bolton und Hunter den Einsatz relativ großer Mengen an Radioaktivität notwendig, deren Verarbeitung nur in besonders ausgerüsteten Laboratorien möglich ist, die dann wiederum für die embryologische Forschung mit Brutschränken usw. eingerichtet werden müßten.

Außer der Jodierung nach Bolton und Hunter wurden von uns auch die Markierungen mit Isethionylacetimidat (1-^{14}C) (Whiteley et al., 1974) sowie mit Succinimidylpropionat (2,3-^{3}H) (keine Referenz) getestet, beide ohne Erfolg. Darauf soll hier nicht näher eingegangen werden.

Die Methode der Markierung mit aktiviertem Biotin, das anschließend durch Reaktion mit Avidin nachgewiesen werden kann (Green et al., 1971), hat in letzter Zeit eine weite Verbreitung gefunden, sowohl für eine Markierung von Antikörpern wie von DNA-Präparaten (Übersichtsartikel: Buckland, 1986). Deshalb lag der Gedanke nahe, solche Biotin-Ester auch auf ihre Verwendbarkeit für die Markierung von Zelloberflächen-Proteinen zu prüfen.

Biotin, auch Vitamin H genannt, ist ein relativ kleines Molekül vom Molekulargewicht 244. Für eine Markierung von Proteinen oder DNA kann es mit verschiedenen aktivierten Estergruppen derivatisiert werden. Seine (selbst bei extremen pH-Werten) enorm stabile, jedoch nicht kovalente Bindung an Avidin (K_D 10^{-15} M) (Green, 1963) war entdeckt worden bei Untersuchungen über vereinzelt auftretende Avitaminosen nach Genuß von rohem Hühnereiweiß, das große Mengen an Avidin enthält. In den letzten Jahren ist das Eiklar-Avidin für Markierungszwecke zunehmend von Streptavidin aus Streptomyces avidinii verdrängt worden, da letzteres aufgrund seines in etwa neutralen isoelektrischen Punktes und Abwesenheit von Zucker- Resten weniger unspezifische Adsorption zeigt als Avidin (IP. ca. 10).
Gegenüber allen anderen bisher veröffentlichten Proteinmarkierungsmethoden hätte eine Reaktion mit Biotin auch den

Vorteil, daß die markierten Moleküle nicht nur elektrophoretisch analysiert, sondern darüber hinaus auch über Affinitätschromatographie an Avidin selektiv isoliert werden könnten.

Als Modell für Markierungen von Plasmamembranen ist besonders häufig die Erythrocytenmembran herangezogen worden; dies einmal aus medizinischem Interesse, zum anderen auch wegen ihres einfachen Aufbaus, ihrer Stabilität und der daraus resultierenden Möglichkeit, sogenannte "ghosts" zu produzieren, leere Zellhüllen, die als Kontrolle für den Markierungsprozeß dienen können. G.A. Orr veröffentlichte 1981 eine Arbeit, in der er zum ersten Mal Biotin für die Markierung und Reinigung von Erythrocytenmembranen verwendete (Orr, 1981). Da jedoch embryonales Gewebe nicht mit Erythrocyten vergleichbar ist, sowie auch im Hinblick auf eine gewünschte Weiterverwendung isolierter Membrankomponenten konnte die Methode von Orr nicht übernommen werden (s. u.). In der Folgezeit erschien noch eine weitere Arbeit, die sich mit der Markierung von Leukocytenmembranen befaßt (Hurley et al., 1985). Eine Affinitätsreinigung von einzelnen Membrankomponenten aus Lymphocyten mit Hilfe des Biotin-Avidin-Systems ist von Updyke und Nicholson beschrieben worden (Updyke und Nicholson, 1984); das Biotin war hier jedoch nicht an die Membranmoleküle direkt, sondern an monoklonale Antikörper gekoppelt, mit welchen die zugehörigen Membran- Antigene dann über eine Chromatographiesäule isoliert wurden.

Auswahl eines geeigneten Biotin-Esters für Markierung und Isolierung von embryonalen Membranmolekülen

Folgende Kriterien wurden bei der Wahl des aktivierten Biotin-Esters aus der großen Zahl der kommerziell erhältlichen berücksichtigt: Die Reaktion mit dem embryonalen Gewebe sollte unter möglichst schonenden Bedingungen durchzuführen sein, sodaß die Markierung nicht nur auf die Oberflächenmoleküle beschränkt bliebe, sondern auch Zelltod weitgehend vermieden würde. Die markierten Moleküle sollten möglichst biologisch aktiv bleiben, was unter anderem die Anwendung extremer pH-Werte verbietet (wichtig vor allem im Hinblick auf eine Affinitätschromatographie). Trotz alledem war natürlich gewünscht, daß der entsprechende Ester möglichst effektiv und mit allen exponierten Molekülen reagiert, also nicht auf bestimmte Molekülklassen wie z. B. Glykoproteine beschränkt wäre.

Alle diese Bedingungen wurden am besten von Biotin-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS) erfüllt. Er bindet unter milden Bedingungen und bei neutralem pH-Wert an freie Aminogruppen, also vor allem an Lysin-Seitenketten. Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-NHS), ähnlich gebaut, jedoch ohne den sechsatomigen "Spacer"-Arm (X), zeigte auf Blots von zweidimensionalen Gelen eine etwas geringere Nachweisempfindlichkeit, wahrscheinlich sekundär bewirkt durch sterische Hinderung bei der Avidin-Bindung, sowie, vielleicht aufgrund seiner geringeren Größe, eine leichte Penetration der Zellmembranen.

Biotin-p-Nitrophenylester wurde ausgeschlossen wegen schlechter Löslichkeit unter zellverträglichen Bedingungen. Das wasserlösliche und daher zunächst optimal erscheinende Sulfosuccinimidyl-6-Biotinamido-Hexanoat dagegen beeinflußte aus ungeklärten Gründen die Auftrennung von Proteinen in Focussierungs-Polyacrylamid-Gelen. Biotin-Hydrazid schließlich dient speziell zur Markierung von Glykoproteinen, die dazu vorher oxidiert werden müssen. Das von Orr verwendete 2-Iminobiotin-NHS (Orr, 1981) schied aus, weil die Bindung von so derivatisierten Proteinen an Avidin nur bei stark alkalischen pH-Werten abläuft.

Inzwischen sind weitere Biotin-Derivate synthetisiert worden, die bei Abschluß der meisten hier beschriebenen Arbeiten noch nicht zur Verfügung standen. Dazu gehören p-Diazobenzoyl-Biocytin (DBB), das, der Jodierung vergleichbar, mit Tyrosin- und Histidin- Resten reagiert, und Maleimido-Butyryl-Biocytin (MBB), entwickelt für die spezifische Markierung von Cystein- und Cystin-Gruppen.

Reaktionsbedingungen für eine Markierung von Zellen oder Geweben mit Biotin-X-NHS

Der für den Markierungsprozeß verwendete Puffer ("Labeling Buffer", L.B.) muß frei sein von allen amino- oder imino-gruppenhaltigen Substanzen, darüber hinaus ebenso von Phosphat, und muß für embryonale Zellen physiologisch verträglich sein, zumindest für die Dauer der Reaktion. Als geeignet erwies sich ein mit Glucose sowie Calcium- und Magnesiumionen zur Membranstabilisierung angereicherter Carbonat-Puffer,

ähnlich aufgebaut wie Hank`s A-Medium (siehe Claviez, 1981). Zu markierende Gewebe oder Zellen müssen zuvor mehrmals in L.B. gewaschen werden.

Biotin-X-NHS ist in L.B. praktisch unlöslich. Deshalb muß vorher eine möglichst konzentrierte Lösung (ca. 200 mg/ml)in wasserfreiem (wichtig!) Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt werden; diese ist wenige Stunden verwendungsfähig. Unmittelbar vor der eigentlichen Reaktion wird die Biotin-DMSO-Lösung auf eine Konzentration von 2 % in L.B. verdünnt, in dem am besten das zu markierende Material schon vorgelegt ist. Falls für dickeres Gewebe eine zweite Zugabe von frischem Biotin erforderlich ist, darf die Endkonzentration von DMSO kurzfristig (wenige Minuten) ca. 5 % betragen, ohne daß die Zellen stark geschädigt werden. Für empfindliche Gewebe, wie z. B. retinale Axone in Zellkultur, sollte die Reaktion dagegen äußerst kurz gehalten werden (ca. 2 min.) und in möglichst wenig DMSO stattfinden.

Nach Beendigung der Reaktion (in der Regel 10-20 min.) wird in aminosäurehaltigem Medium gewaschen, um überschüssiges Biotin abreagieren zu lassen. Am besten eignet sich hierzu Eagles` Medium (siehe Halfter, 1983) o. ä.

Um eine möglichst effektive Markierung in kurzer Zeit zu erreichen, erwies sich eine Konzentration von 1 mg Biotin-X-NHS pro 10^7 Zellen im Milliliter oder 1 mg Biotin-X-NHS pro 25 mg Gewebe-Feuchtgewicht als optimal. Durch eine Erhöhung dieser Konzentration ließ sich auf Blots von Gelen der markierten Proben keine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit mehr erreichen.

Um zu beweisen, daß die vorstehende Biotinylierung wirklich nur Membranoberflächen- und Matrixproteine erfaßt, wurden umfangreiche Versuche durchgeführt, die im folgenden nur teilweise wiedergegeben werden sollen.

Untersuchung von biotinylierten Proben mit dem Lichtmikroskop

a) Eine konfluente Kultur von embryonalen Hühner-Fibroblasten in einer Petrischale wurde, wie oben beschrieben, mit Biotin-X-NHS markiert. Nach dem Waschen in Eagles`Medium wurde das Medium in der Schale auf eine Konzentration von 3,5 % Formaldehyd gebracht. Nach 30 Minuten Fixierung wurde zweimal in PBS gewaschen und dann eine Stunde lang mit Fluorescein-Isothiocyanat-gekoppeltem Streptavidin inkubiert (Amersham; 1:100 verdünnt in PBS). Eine Blockierung unspezifischer Bindung mit Serumalbumin o.ä. erwies sich als unnötig. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurde die Fibroblastenkultur im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 1b) und unter Phasenkontrast-Optik (Abb. 1a) betrachtet.
In der FITC-Streptavidin-Fluoreszenz leuchten nur die Zellgrenzen und vor allem die von den Fibroblasten synthetisierte Fibronectin-Matrix auf. Eine Kontrollkultur, die nicht biotinyliert, ansonsten aber gleich behandelt worden war, zeigte keine Fluoreszenz. Daraus kann geschlossen werden, daß Biotin-X-NHS nur mit Zelloberflächen- Molekülen reagiert hat.

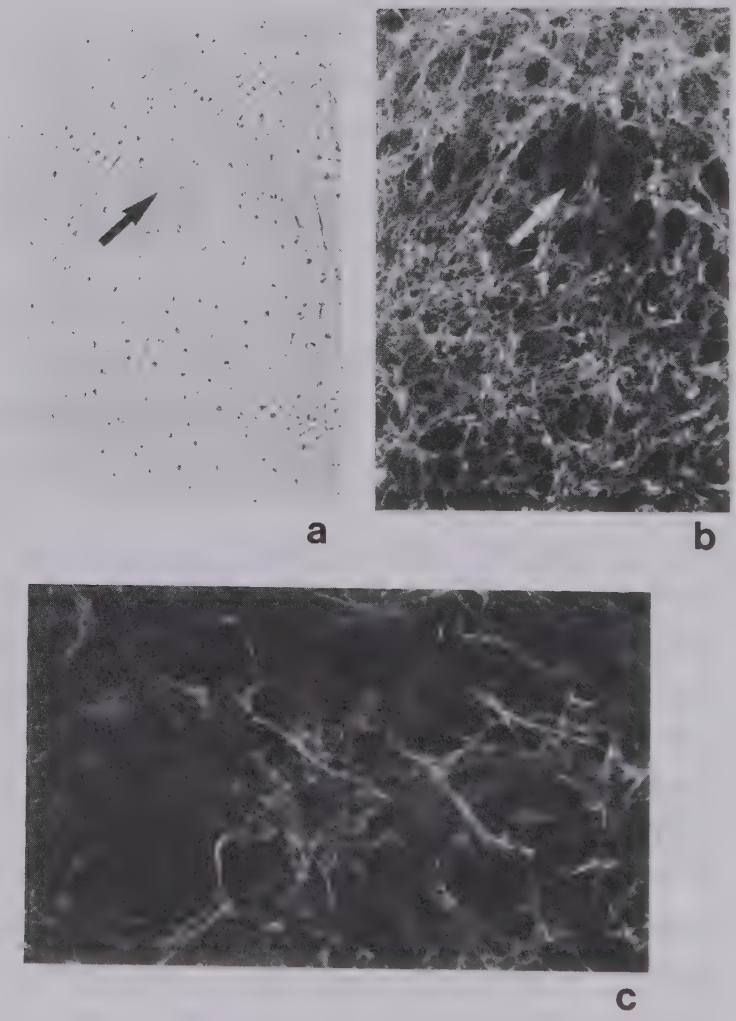

Abb.1: Kultur embryonaler Hühner- Fibroblasten, biotinyliert. 1a): Zum Vergleich in Phasenkontrast- Optik, Vergr. ca. 200 x; 1b): Fluoreszenz der biotinylierten Oberflächen- und Matrix- Proteine nach Inkubation mit Fluoreszein-Streptavidin; 1c): wie b), in höherer Vergrößerung.

b) Ein Hühnertectum vom Embryonaltag E8 wurde wie üblich präpariert, 5 min. in L. B. getaucht, noch einmal in L. B. gewaschen und mit Biotin-X-NHS 15 min. lang inkubiert. Dann wurde das Gewebe in 4 % Paraformaldehyd in Kaliumphosphat-Puffer 2 Stunden lang fixiert, für einige Stunden in 25 % Sucrose in PBS eingelegt, bis es mit der Rohrzuckerlösung isoton war. Danach wurden auf dem Gefriermikrotom 20 µm-Schnitte angefertigt, die auf mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen wurden. Nach dem Antrocknen der Schnitte wurden diese wieder mit FITC-Streptavidin 1:100 in PBS für 1 Stunde überschichtet, zweimal gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Ergebnis zeigt Abb. 2. Die Zellen selbst bleiben dunkel, nur die Zellgrenzen und die Extrazellulärmatrix sind zu sehen.
Aus diesen Versuchen ist auch ersichtlich, daß die Biotin-Avidin-Bindung durch eine Fixierung der markierten Proteine nicht beeinträchtigt wird.

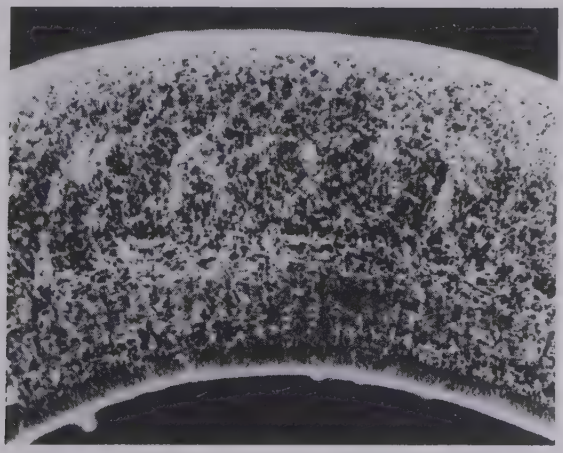

Abb.2: Tectum E8, biotinyliert, 20 um- Gefrierschnitt, mit Fluorescein- Streptavidin inkubiert, Vergr. ca. 100 x.

Untersuchung von biotinylierten Proben mit dem Transmissionselektronenmikroskop

a) Zunächst sollte überprüft werden, inwieweit durch die Bedingungen der Reaktion mit Biotin-X-NHS und DMSO in L. B. das zu markierende Gewebe geschädigt würde. Dazu wurde auf einen Nachweis des gebundenen Biotins verzichtet (siehe b, c), da durch die hierfür verwendeten Lösungsmitel allein schon eine Schädigung des Gewebes zu erwarten war. Statt dessen wurde ein Tectum E10 mit Biotin markiert, fixiert in 2,5 % Glutaraldehyd in PBS (1 Stunde bei Raumtemperatur) und für die Transmissionselektronenmikroskopie weiterverarbeitet. Abb. 3 zeigt einen Ultradünnschnitt durch eine faserreiche Region an der Tectumoberfläche. Man erkennt längs- und quergeschnittene Faserbündel mit darin befindlichen, offensichtlich gut erhaltenen Mikrotubuli. Dieses und andere Ergebnisse (s. u.) sprechen dafür, daß der Markierungsprozeß das Gewebe weitgehend intakt läßt.

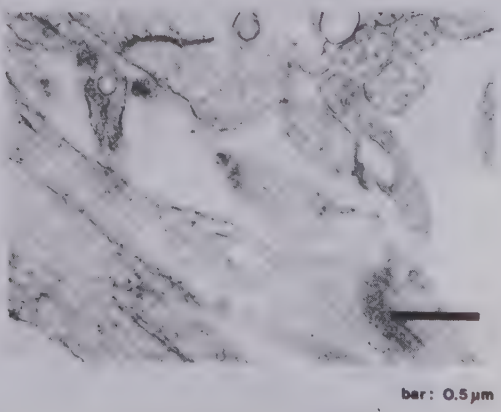

Abb.3: Gewebeerhaltung nach Biotinylierung: Ultradünnschnitt durch ein E10- Tectum, biotinyliert, kontrastiert mit Bleicitrat und Uranylacetat. Das Biotin wurde hier nicht mit markiertem Avidin nachgewiesen.

b) In zwei weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Reaktion mit Biotin tatsächlich auf Oberflächen- und Matrixproteine beschränkt bleibt. Eine E6-Retina wurde präpariert, mit Biotin-X-NHS markiert wie beschrieben, 2 Stunden lang in 4 % Paraformaldehyd in Kaliumphosphat-Puffer fixiert, gewaschen und mit Streptavidin-Peroxidase (Amersham; 1:250 in PBS) eine Stunde inkubiert. Nach gründlichem Waschen und einer Nachfixierung wurde das Präparat mit Diamino-Benzidin und H_2O_2 (siehe Halfter, 1983) umgesetzt. Das im Licht- wie im Elektronenmikroskop sichtbare bräunliche Reaktionsprodukt präzipitiert dabei an den Stellen, an denen Streptavidin-Peroxidase an Biotin gekoppelt ist; es ist so ein Nachweis für Biotin-markierte Proteine.
In Abb. 4 sieht man einen Ultra-Dünnschnitt durch eine Retina E6, hier in der Nähe des Glaskörpers. Markiert sind deutlich die fibrillären Strukturen der inneren Basallamina sowie die Oberflächen der quergeschnittenen Axone und der Glia-Endfüßchen, die den Abschluß der Retina zum Glaskörper hin bilden.

c) Auch der Versuch eines Biotin-Nachweises mit Streptavidin-Gold wurde unternommen. Vorversuche hatten ergeben, daß das Streptavidin mit den adsorbierten 15 nm-Goldpartikeln (Janssen, Belgien) nur äußerst schlecht in Tectum-Gewebe (hier E8) eindringen konnte. Deshalb wurden von dem markierten und fixierten Tektum zunächst dickere Schnitte (50 um) auf einem Gefriermikrotom angefertigt, die dann über Nacht mit Gold-Streptavidin 1:10 in PBS inkubiert wurden. Das anschließende Waschen des Präparats in PBS mußte ebenfalls sehr gründlich und über mehrere Stunden durchgeführt werden. Durch die Prozedur des Schneidens auf dem Gefriermikrotom ist

Abb.4: Ultradünnschnitt durch eine E6- Retina, biotinyliert. Kontrastiert mit Bleicitrat; Biotin- Nachweis mit Streptavidin- Peroxidase, DAB und H_2O_2. BL: Basallamina (vitreal); AX: Axone; GEF: Glia- Endfüßchen.

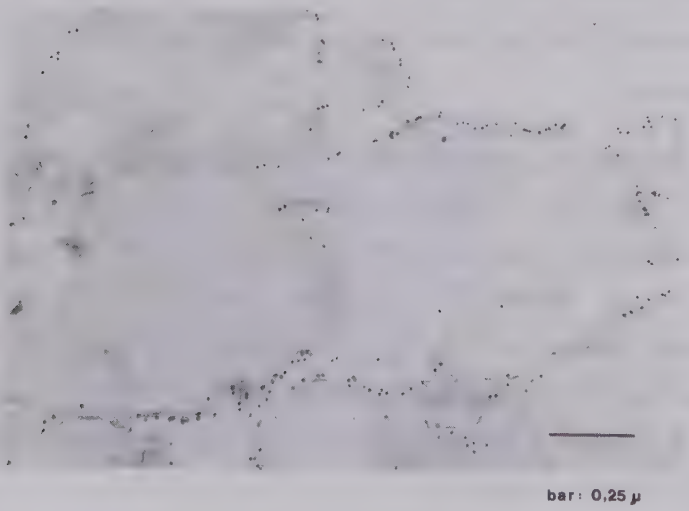

Abb. 5: Ultradünnschnitt durch ein E8- Tectum, biotinyliert. Biotin-Nachweis mit Gold- Streptavidin (15 nm), Gewebe vor Inkubation mit Gold-Streptavidin auf dem Gefriermikrotom in 50 um- Schnitte zerlegt. Kontrastiert mit Bleicitrat.

das Gewebe sehr stark geschädigt worden. Dennoch erkennt man in Abb. 5, daß die als kontrastreiche dunkle Punkte sichtbaren Goldpartikel nur mit Zellmembranen bzw. Resten davon assoziiert sind. Dies ist ein umso stärkerer Hinweis auf eine Biotin-Markierung ausschließlich der Zelloberflächen,als das Gold-Streptaividin in die beim Einfrieren zerplatzten Zellen gut hätte hineindiffundieren können.

In vitro-Explantate von Biotin-markierten Retinae

Eine Hühnchenretina E6 wurde präpariert, auf einem sterilen Membranfilter ausgebreitet (siehe Claviez, 1981), und auf dem Filter mit Biotin-X-NHS unter sterilen Bedingungen markiert (10 min, 1 mg Biotin-X-NHS). Anschließend wurden wie üblich von der Retina schmale Streifen geschnitten und diese auf Collagen-beschichtete Petriperm-Schalen explantiert (Claviez, 1981). Gegenüber einer nicht biotinylierten Kontroll- Retina war das Faserwachstum allenfalls geringfügig vermindert, sodaß man auf eine weitgehend intakt gebliebene Retina schließen konnte.
Die in Kultur ausgewachsenen Axone waren jedoch nur äußerst schwach markiert, wie eine Anfärbung mit FITC-gekoppeltem Streptavidin ergab. Dies steht im Gegensatz zu Markierungen mit Biotin in vivo mit direkter Injektion in den Glaskörper, wo Axone kräftig markiert werden und bis ins Tektum verfolgt werden können (Halfter, 1987).

Gelelektrophoretische Auftrennung von Biotin-markierten Proben

Mit Hilfe der gelelektrophoretischen Analyse oberflächenmarkierter Proben und anschließendem Nachweis der biotinylierten Proteine nach Übertragung auf einen Membranfilter ("Blot") lassen sich Unterschiede in der Proteinzusammensetzung verschiedener Zelloberflächen sehr rasch und einfach erfassen. Eine eindimensionale Auftrennung allein nach dem Molekulargewicht der Proteine (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970) ist dafür allerdings nicht ausreichend, allenfalls bei sehr einfach zusammengesetzten Zellmembranen wie denen von Erythrocyten. Während die Bindung von Biotin (Molekulargewicht 244) an ein Protein zwar dessen Molekulargewicht und damit auch elektrophoretische Beweglichkeit im SDS-Gel kaum verändert, kann sich jedoch (aufgrund der Bindung an die basischen Lysin-Seitenketten) der isoelektrische Punkt verschieben. Auch die Bindung mehrerer Biotin-Moleküle an ein individuelles Protein ist zu erwarten, und zwar umso eher, je basischer das markierte Protein ist. Für eine zweidimensionale Analyse, bei der die Trennung nach isoelektrischen Punkten der nach Molekulargewicht vorangeht (O'Farrell, 1975), müssen deshalb zu vergleichende Proben nach einem standardisierten Protokoll und möglichst in einem Ansatz markiert werden. Im zweidimensionalen Gel ist die Zuordnung von Biotin-markierten Punkten zu dem Punktmuster eines Vergleichgels, bei dem die Gesamtheit aller Proteine angefärbt wurde, streng genommen nur dann möglich, wenn die entsprechenden Proteine auch im Vergleichsgel biotinyliert vorliegen. Andererseits kann davon ausgegangen werden, daß mit der oben beschriebenen Methode ein gege-

benes Protein niemals erschöpfend biotinyliert werden wird, da es zum größten Teil in der Zellmembran eingebettet ist, sodaß sich die Markierung vielleicht nur in einer geringfügigen Verschiebung des isoelektrischen Punktes auswirkt.

Um auch die in der Embryologie zumeist sehr geringen Materialmengen analysieren zu können, wurde die Gelelektrophorese im Mikromaßstab durchgeführt. Die methodischen Voraussetzungen waren kürzlich geschaffen worden (Neukirchen et al., 1982; Boxberg, 1984). Die Trennung der Proteine nach isoelektrischen Punkten in der ersten Dimension erfolgte als Nichtgleichgewichts-Fokussierung (NEPHGE) in Mikrokapillaren von 7 cm Länge und 0.56 mm Durchmesser. Für die nachfolgende Trennung nach Molekulargewicht durch SDS-PAGE wurden Flachgele von 0.1 mm Dicke verwendet, die zur besseren Handhabung kovalent mit einer Glasplatte verbunden sind.
Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Filter, Voraussetzung für den Nachweis der biotinylierten Proteine mittels Avidin, ist ein elektrophoretisches Blotting nach Towbin (Towbin, 1979) nicht möglich; stattdessen genügt hier eine simple Diffusions-Blotting-Technik (Boxberg, 1984). Nach der Übertragung des Proteinmusters auf den Filter wurden biotinylierte Oberflächen- und Matrixproteine durch Inkubation des Blots mit Streptavidin sichtbar gemacht; das Streptavidin kann dazu entweder radioaktiv markiert sein - ein ^{35}S-"Label" ist hier einem ^{125}J-"Label" unbedingt vorzuziehen (persönl. Beobachtung) - oder es kann mit einem Enzym gekoppelt sein, in der Regel mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase. Im ersten Fall wird der Blot getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert; im zweiten Fall wird das gebundene Streptavidin durch eine Farbreaktion

direkt auf dem Blot nachgewiesen. Zum Vergleich des Zelloberflächen-Proteinmusters mit dem Gesamtmuster des Homogenats wird entweder ein Parallelgel mit Silber angefärbt (Ansorge, 1982), oder ein Blot mit kolloidalem Gold.

Nachweisempfindlichkeit der Biotin-Markierung auf Gelen

Um die Nachweisgrenze für Biotin-markierte Proteine auf Blots zu ermitteln, wurde eine Probe von Rinderserum-Albumin in Lösung biotinyliert, eine Verdünnungsreihe davon erstellt, und Aliquots von 1 ul von jeder Verdünnung auf SDS-Gele aufgetragen (Breite der Auftragszone 10 mm). In einer Silberfärbung eines solchen Gels waren 50 pg (biotinyliertes) Albumin pro Bande noch zu erkennen; auf einem Blot konnten mittels einer Peroxidase-Reaktion mit H_2O_2 als Substrat und 4-Cl-1-Naphtol als Farbstoff etwa 25 pg noch sicher nachgewiesen werden. Um 25 pg biotinyliertes Albumin mit ^{35}S-Streptavidin auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen, genügte eine Expositionsdauer von ca. 1 Tag. Mit radioaktivem Streptavidin lassen sich daher bei längerer Expositionszeit biotinylierte Proteine noch unterhalb des pg-Bereichs analysieren. Für zweidimensionale Gele kann man in der Regel von einer noch höheren Empfindlichkeit ausgehen, da die einzelnen Proteine hier nicht in Banden, sondern konzentriert in Punkten vorliegen.

Anwendungsbeispiele für die Biotin-Markierung mit anschließender 2D-Gelelektrophorese

a) Vergleich der Oberflächen- und Matrixproteinmarkierung mit dem Gesamtproteinmuster des Tectums: Die Abb. 6a-c zeigen drei Blots von parallel durchgeführten zweidimensionalen Auftrennungen eines E10-Hühnchen-Tectum-Homogenats; für a und b war das Tectum wie zuvor beschrieben mit Biotin-X-NHS markiert worden.

In Abb. 6a ist das Gesamtproteinmuster dargestellt; hierzu wurde der Blot mit kolloidalem Gold angefärbt. Für Abb. 6b wurde der Blot mit ^{35}S-Streptavidin 1:1500 (Amersham) in PBS inkubiert, getrocknet und mit Röntgenfilm exponiert. Der Aktin- Fleck (in einem Vorversuch mittels eines anti-Aktin-Antiserums ermittelt) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Von der Biotin-Markierung (Abb. 6b) ist Aktin als intrazelluläres Protein deutlich nicht erfaßt; dadurch ist ein weiterer Beweis für eine tatsächliche Beschränkung der Biotinylierung auf Oberflächenproteine erbracht. Auffällig in Abb. 6b ist die starke Betonung der hochmolekularen und zumeist sauren Extrazellulärmatrix-Proteine. Weiterhin sind die langen Reihen der Protein- Flecken zu beachten, die weiter unten diskutiert werden sollen.

In Abb. 6c wurde eine parallele Auftrennung von unmarkiertem Tectum durchgeführt, der Blot aber anschließend mit radioaktivem Streptavidin inkubiert. Dadurch sind hier ausschließlich die endogenen Biotin-haltigen Proteine angefärbt.

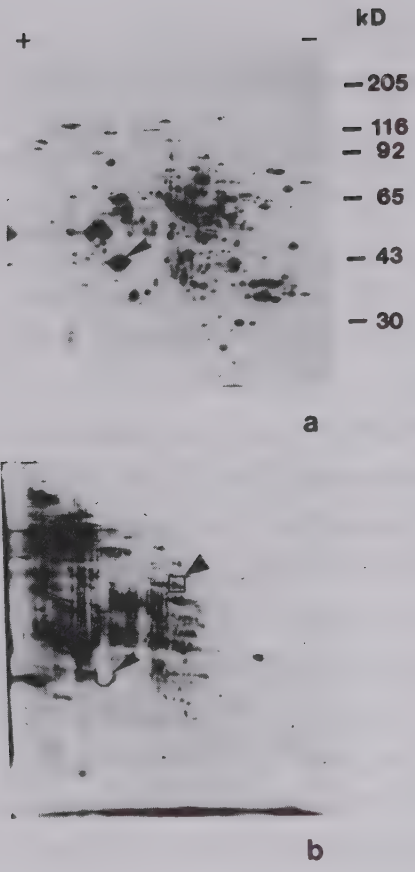

Abb. 6: 2D- gelelektrophoretische Auftrennungen von E10-Tectum- Homogenat. Für 6a) und b) war das Tectum zuvor biotinyliert worden, für c) dagegen nicht. 6a) mit kolloidalem Gold gefärbter Blot; b) und c) mit ^{35}S-Streptavidin 1:1500 inkubiert und auf Röntgenfilm exponiert.

b) **Vergleich des Oberflächen- und Matrixproteinmusters des Tectums in verschiedenen Entwicklungsstadien:** E5, E7, E10, E13: Abb. 7a-d.

Diese vier Stadien entsprechen folgenden biologischen Ereignissen: Am Tag 5 (Abb. 7a) befinden sich im Tectum noch keine retinalen Fasern; möglicherweise sind chemische Positionsmarker auf den Zelloberflächen noch nicht ausgeprägt. Im E7-Tectum (Abb. 7b) haben die ersten retinalen Axone ihr Ziel erreicht. Dieser Prozeß setzt sich bis zum Tag E11 fort und dürfte etwa am Tag E10 (Abb. 7c) seinen Höhepunkt haben. Am Tag E12 ist die Synaptogenese der retinalen Axone mit ihren Zielzellen weitgehend abgeschlossen, am Tag E13 beginnt bereits der Rückzug "überzähliger" oder fehlgeleiteter Axone (Abb. 7d).

Bei der gelelektrophoretischen Analyse des Oberflächenproteinmusters in diesen vier Stadien fällt zunächst die starke Veränderung bei den sauren, hochmolekularen Proteinen (wahrscheinlich ECM; Pfeil) auf. Einige weitere Änderungen sind ebenfalls markiert. Zum jetzigen Zeitpunkt lassen sich diese Daten jedoch noch nicht direkt mit den biologischen korrelieren, da die Funktion der betreffenden Proteine nicht bekannt ist.

c) **Vergleich des Oberflächen-Proteinmusters von nasalen und temporalen retinalen Axonen:** Das unterschiedliche Verhalten von nasalen und temporalen Axonen in Kultur, z.B. hinsichtlich der Bindung von tectalen Membranvesikeln (siehe Kapitel II), sollte ein biochemisches Korrelat auf der Ebene des Oberflächen-Proteinmusters haben. Abb. 8a und b zeigen Blots von zweidimensionalen Gelen von retinalen Axonen, die in vitro auf Kollagen gezüchtet (Claviez, 1981) und in der

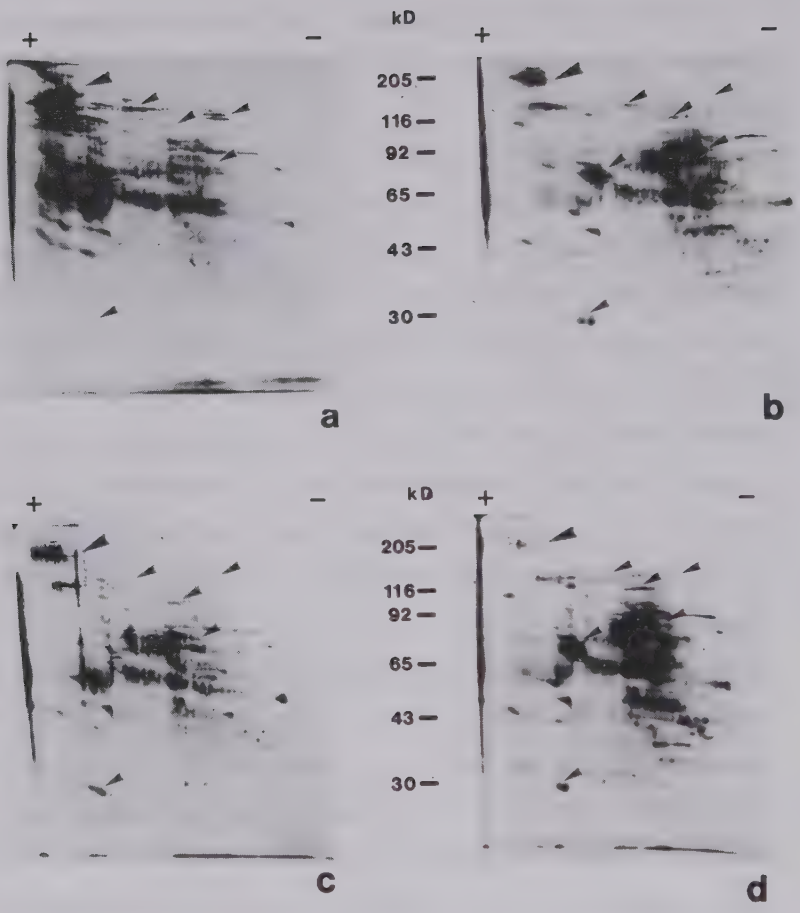

Abb.7: 2D- Auftrennungen von biotinylierten Tecta E5 (a), E7 (b), E10 (c), E13 (d). Die Gele wurden geblottet, die Blots dann mit radioaktivem Streptavidin 1:1500 inkubiert.

Kulturschale 2 min. lang mit Biotin-X-NHS markiert worden waren. Für Abb. 8a war nur die nasale, für 8b nur die temporale Retina durch Mikrodissektion geerntet worden. Man erkennt einen Unterschied im Proteinmuster im Molekulargewichtsbereich um 40 kD (Pfeil); ansonsten sind beide Muster weitgehend identisch. Abb. 8c stellt zum Vergleich eine Anfärbung aller Faserproteine dar.

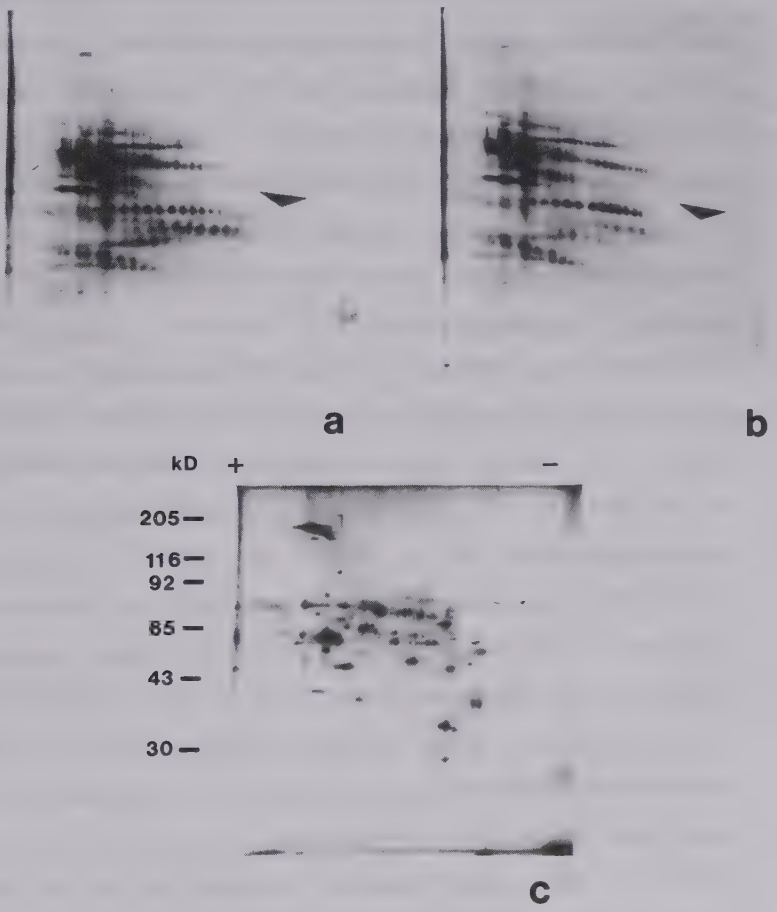

Abb.8: 2D- Gele von biotinylierten, in Kultur gezüchteten retinalen Axonen. 7a): Nasale Axone; b): Temporale Axone. c): Zum Vergleich Anfärbung des Gesamt- Proteinmusters.

Vergleich zwischen der Oberflächenmarkierung mit Biotin-X-NHS und mit Maleimido-Butyryl-Biocytin (MBB)

Zur Deutung der Proteinfamilien-artigen Punktreihen

In den vorstehend abgebildeten zweidimensionalen Gelen von Biotin-markierten Proben fallen immer wieder die langen Reihen von Protein- Flecken auf, die oft zum basischen Ende des Gels hin geneigt sind. Wie schon erwähnt, könnte es sich dabei um Artefakte handeln, die entstehen, wenn einzelne Moleküle eines bestimmten Proteins mit einer jeweils unterschiedlichen Anzahl von Biotinestern reagieren. Der isoelektrische Punkt der markierten Moleküle würde sich dann in Abhängigkeit von der Anzahl der gebundenen Biotine mehr oder weniger stark verschieben.
Die deutliche Neigung vieler dieser Reihen spricht jedoch eher dafür, daß es sich um echte Protein-"Familien" handeln könnte, die aus einem Grundprotein mit verschieden starker Glykosylierung, Sulfatierung o.ä. zusammengesetzt sind. Das Molekulargewicht von Biotin ist zum einen viel geringer als die Molekulargewichtsdifferenz zwischen zwei derartigen Punkten im Gel. Zum anderen sind solche Reihen ohnehin typisch für Zellmembranproteine. Als Beispiel mögen hier die mit monoklonalen Antikörpern isolierten (und nicht biotinmarkierten) Membranproteine G4 und F11 (Rathjen, 1987) dienen, die das Bündelungsverhalten von Fasern in Kultur beeinflussen. Bei genauem Hinsehen entdeckt man solche Reihen von Protein- Flecken auch auf zweidimensionalen Gelen von nichtbiotinyliertem Gewebe.

Kürzlich wurde nun ein aktivierter Biotin-Ester (MBB) synthetisiert (Bayer, 1985), der statt an Lysin-Reste wie Biotin-X-NHS an Cystein und Cystin bindet, und dabei den isoelektrischen Punkt des Proteins nicht verändert. Natürlich wären auch mit MBB Mehrfach-Markierungen an Einzelproteinen möglich. Diese dürften jedoch im zweidimensionalen Gel praktisch nicht aufgelöst werden. In Abb. 9a und b sind zwei parallele Auftrennungen von E10-Tectum dargestellt; für Abb. 9a war das Tektum zuvor wie üblich mit Biotin-X-NHS markiert worden, für Abb. 9b dagegen mit MBB. Man erkennt, daß durch MBB insgesamt eine vergleichsweise geringere Anzahl von Proteinen markiert wird, und daß bestimmte, wahrscheinlich besonders schwefelhaltige Proteine, stärker markiert werden als mit Biotin-X-NHS. Vor allem ist jedoch wichtig, daß auch nach der Markierung mit MBB Reihen von Protein- Flecken auftauchen, ähnlich denen nach Biotin-X-NHS-Markierung. Von daher dürfte es sich, zumindest bei einem großen Teil dieser Reihen, um wirkliche Protein-"Familien" handeln.

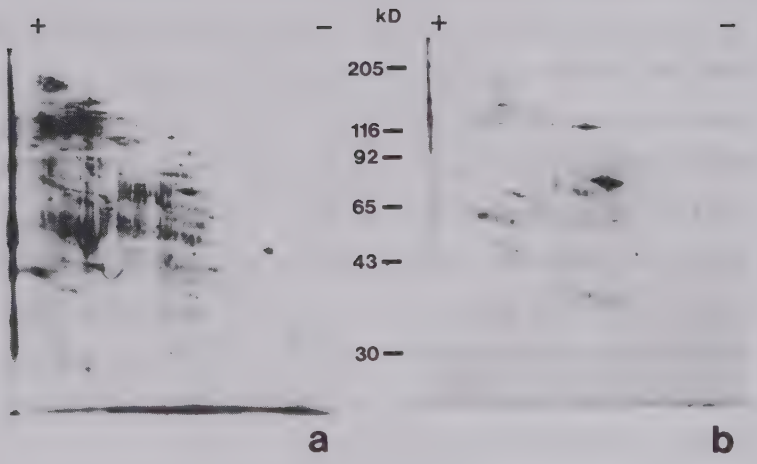

Abb.9: Vergleich zwischen einer Zelloberflächenprotein-Markierung mit Biotin-X-NHS und mit MBB. Die 2D- Gele wurden geblottet, und die Blots mit radioaktivem Streptavidin inkubiert und auf Röntgenfilm exponiert.

Affinitätschromatographie der biotinylierten Zelloberflächen- und Matrix-Proteine an Avidin-Agarose

Für eine chromatographische Trennung von Zellmembran-Komponenten ist die Wahl geeigneter Solubilisierungsbedingungen im allgemeinen sehr kritisch, da viele Membranproteine aufgrund der Wechselwirkung ihrer langen hydrophoben Domänen stark "zusammenkleben" und auch zur Micellen-Bildung mit Detergentien neigen. Im Hinblick auf eine Affinitätschromatographie biotinylierter Proteine an Avidin-Agarose kommt als weiteres Problem hinzu, daß durch das gewählte Detergens die Avidin-Biotin-Bindung nicht gestört werden darf. Für eine gewünschte Erhaltung der biologischen Aktivität der isolierten Proteine sollte das Detergens zudem möglichst schonend solubilisieren, die Proteine sollten renaturierbar sein.
In eigenen Versuchen zur Membransolubilisierung hatte sich immer wieder Harnstoff am besten bewährt, zumal er durch Dialyse gut entfernt werden kann, und die Proteine danach ihre Aktivität auch meist behalten. Für die Biotin-Affinitätschromatographie scheidet Harnstoff jedoch aus, weil er in Molaritäten über 1 M die Bindung zwischen Biotin und Avidin hemmt.
Updyke und Nicholson (1984) benutzten für ihre Reinigung von Membranantigenen mit biotinylierten monoklonalen Antikörpern an einer Streptavidin-Matrix ein Gemisch aus jeweils 2.5 % Nonidet P40 und Zwittergent-314. Auch diese Möglichkeit wurde verworfen, da eine vollständige Entfernung dieser Detergentien zu große Schwierigkeiten bereiten würde.
Nach einigen Vorversuchen wurde schließlich eine Lösung von 0.2 % Desoxycholat (DOC) in PBS, pH 8.3, gewählt. Der leicht

alkalische pH-Wert ist nötig, weil eine DOC-Lösung bei pH-Werten unter 7.5 gelartig erstarrt. Das in 0.2 % DOC unlösliche Material enthält nur noch geringe Mengen an biotinylierten Proteinen, was gelelektrophoretisch überprüft wurde.
Als Affinitätschromatographie-Material diente kommerziell erhältliche Avidin-Agarose. Um einen Verlust biotinylierter Proteine während der Chromatographie zu vermeiden, der durch besonders feste Biotin-Bindungsstellen im Avidin entstehen kann (diese Bindungen lassen sich dann nur noch durch 4 M Guanidinium-HCl aufsprengen), wurde das Avidin zunächst mit Biotin abgesättigt, um dann durch Behandlung der Matrix mit 0.1 M Glycin-HCl, pH 2.0, nur solche Bindungsstellen freizulegen, von denen biotinylierte Proteine auf schonende Weise eluierbar sind.
Eine Chromatographie-Säule von 150 ul Gelbett-Volumen kann biotinyliertes, DOC-solubilisiertes Protein von mindestens 20 Tecta E10 binden. Im Waschpuffer erscheint dann kein Biotin-haltiges Material.
Der gesamte, von Hand durchgeführte Säulenlauf wurde verfolgt, indem von allen, je 300 ul enthaltenden, Fraktionen Aliquots von je 1 ul in einem Dot-Blot-Verfahren auf Vorhandensein von Biotin getestet wurden. Die "positiven" Fraktionen wurden - für beide Elutionsarten separat - vereinigt, mit einem 10-fachen Überschuß eiskalten Ethanols gefällt und noch zweimal mit 80 %igem kalten Ethanol gewaschen (um eine weitgehende Entfernung der Detergentien zu bewirken), bevor sie für eine spätere Verwendung bei -20° C eingefroren wurden.

Der bei weitem überwiegende Teil des gebundenen Zelloberflächen-Materials konnte spezifisch mit 1 mg/ml D-Biotin im Laufpuffer eluiert werden, also unter besonders schonenden

Bedingungen (über 90 %). Nur ein kleiner Rest mußte durch Elution mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,0, und 0,5 % Nonidet P40 von der Säule gewaschen werden. Abb. 10 zeigt eine densitometrische Auswertung des Elutionsprofils. Die spezifische Elution mit D-Biotin wird durch Striche, die Elution mit Glycin-HCl durch Pünktchen symbolisiert.

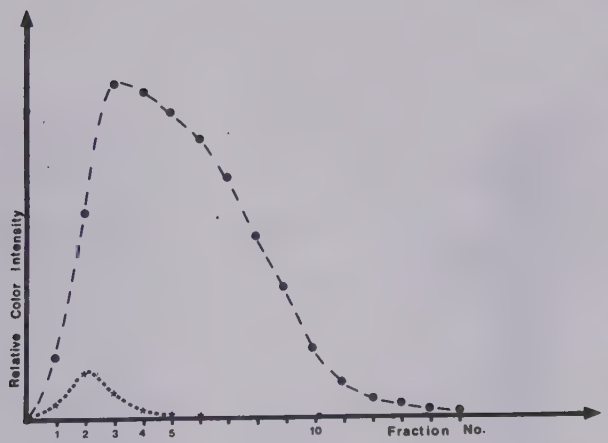

Abb. 10: Densitometrische Auswertung der Avidin- Agarose-Affinitätschromatographie von biotinylierten Tectum- Membran-Material. Hierzu wurden Dot- Blots von 1ul- Aliquots der gewonnenen Fraktionen mit Streptavidin- Peroxidase gefärbt und mit einem "Quick Scan"- Densitometer (Helena Lab, USA) ausgewertet.

In Abb. 11 a und b ist eine zweidimensionale Analyse der mit beiden Methoden eluierten Proteine dargestellt (Abb. 11 a: Elution mit Biotin; Abb. 11 b: Elution mit Glycin-HCl). Beim Vergleich mit einem Gel von einer Biotin-Markierung des Tectums, also des eigentlichen Ausgangsmaterials der Affinitätschromatographie, fällt auf, daß nicht alle markierten Proteine auch isoliert werden konnten; außerdem sind einige stärker angereichert als andere. Durch die Elution mit pH 2 werden andere Proteine freigesetzt als bei der Biotin-Elution, die beiden Methoden ergänzen sich. Dadurch ist die Möglichkeit einer gezielten Anreicherung einer Subfraktion der Oberflächen- und Matrixproteine gegeben.

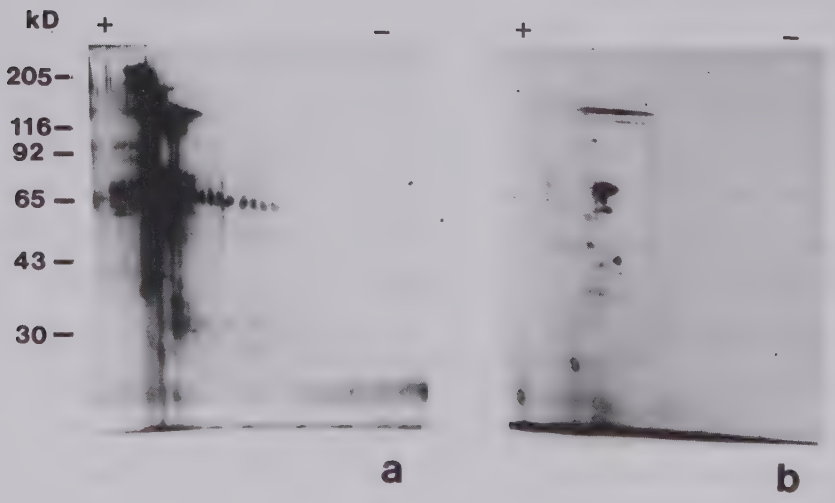

Abb.11: Isolierung biotinylierter Oberflächenproteine über Avidin-Affinitätschromatographie: 2D- Auftrennung der beiden Eluate der Affinitätschromatographie; 11a): Elution mit D-Biotin in Laufpuffer; b): Elution mit Glycin-HCl pH 2.0

Ausbeute und Anreicherungsfaktor der Affinitätschromatographie

Die mit dieser Methode erzielte Ausbeute an Oberflächen- und Matrixproteinen kann nur abgeschätzt werden, da die isolierte Proteinmenge für eine Proteinbestimmung nicht ausreichend war. Sie beträgt etwa 0,1 -0,2 % des Ausgangsmaterials an Gesamtprotein, was durch einen Vergleich der Intensität von Silberfärbungen von Gelen ermittelt wurde. Unbeantwortet bleibt bisher die Frage, wieviel Prozent des tatsächlich vorhandenen Oberflächenproteins dies repräsentiert.

Für das bekannte Zellmembran-Protein N-CAM konnte der Anreicherungsfaktor näherungsweise bestimmt werden, und zwar auf folgende Weise: E9- Tectum- Homogenat und Eluat der Affinitätschromatographie wurden nebeneinander eindimensional im SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet, und der Blot nacheinander zuerst mit anti-N-CAM-IgG (Geschenk von F. Rathjen) (20 µg/ml in PBS), dann mit einem ^{125}J-markiertem zweiten Antikörper inkubiert. Auszählen der gebundenen Radioaktivität ergab 1492 cpm für das Biotin-Eluat der Avidin-Säule, 1150 cpm für das Tectum-Homogenat (gemittelt aus drei Messungen). Mit Glycin-HCl war dagegen kein N-CAM eluiert worden (48 cpm). Anschließend wurde das Tectum-Homogenat soweit verdünnt, bis eine Silberfärbung eines eindimensionalen Geles von Biotin- Eluat und von Tectum- Homogenat ungefähr die gleiche Intensität hatte (ca. 100fach). Der Verdünnungsfaktor von 100 ist damit gleichzeitig ein ungefähres Maß für die Anreicherung von N-CAM im Biotin-Eluat.

In beiden Eluaten war Tubulin, ein nur intrazellulär vorkommendes Protein, immunologisch nicht nachweisbar.

KAPITEL II

Fraktionierung von Tectum-Membranen und Test der erhaltenen Vesikel auf Adhäsivität an retinale Axone in vitro

Einführung

Bereits 1981 war es W. Halfter (Halfter et al., 1981) gelungen, aus Hühnchentectum durch differentielle Zentrifugation angereicherte Plasma- Membranen zu gewinnen, die an Retina-Neuriten in Kultur binden. Diese Versuche stellen eine konsequente Weiterentwicklung der Arbeiten von Barbera (Barbera, 1975), Glaser (Merrel et al., 1973) und anderen dar, die in Zell-Zell-Aggregationsversuchen eine erhöhte Affinität von Zellen aus der dorsalen Retina an solche aus ventralem Tectum und umgekehrt gefunden hatten, ein Ergebnis, das den tatsächlichen Projektionsverhältnissen im retino-tectalen System entspricht.
Membranvesikel des Tectums vom 9. Embryonaltag werden von Axonen der nasalen Retina bevorzugt gebunden, verglichen mit solchen der temporalen Retina. In einem anderen Testsystem (Kern-Veits, 1985) mit separater Membranaufarbeitung von anteriorem (rostralem) und posteriorem (caudalem) Tectum schließlich konnte eine erhöhte Affinität von temporalen Retina- Neuriten für anteriores Tectum als Wachstumssubstrat demonstriert werden.

Die Sensibilität der Membranvesikel-Bindung an Neuriten gegenüber einer Trypsin-Vorbehandlung der Vesikel legt den Schluß nahe, daß es sich bei der "aktiven Komponente" um ein oder mehrere Proteine handelt. Interessanterweise bleibt die

Bindungsfähigkeit der Membranen auch nach einer Glutaraldehyd- Fixierung, die ja immerhin eine Denaturierung der Proteine und eine mögliche Änderung ihrer Konformation mit sich bringt, voll erhalten. Die retinalen Axone dagegen müssen für den Test lebendig sein (Halfter, 1983).

Im folgenden werden nun Versuche beschrieben, die für den Adhäsionstest verwendeten Membranen weiter zu fraktionieren, um die für die Bindung entscheidende Protein- Komponente näher einzugrenzen.

Entwicklung einer neuen Präparationsmethode für Membranvesikel

In dem von Halfter 1981 beschriebenen Verfahren werden Membranproteine gegenüber dem gesamten Zellprotein um den Faktor 4 angereichert. Eine höhere Anreicherung durch differentielle Zentrifugation ist bisher noch nie erreicht worden. Auf diesem Wege wäre also der Versuch einer weiteren Reinigung der Membranen oder gar einer Fraktionierung wenig aussichtsreich. Deshalb wurde nach einer gänzlich anderen Methode zur Membranpräparation gesucht. Folgende Vorüberlegungen führten schließlich zum Erfolg:
Aus Versuchen zur Solubilisierung von Tectumgewebe war bekannt, daß hochmolare Harnstofflösungen ein besseres Lösungsvermögen aufweisen als alle bekannten Detergenzien, mit Ausnahme von SDS. Dabei arbeitet Harnstoff gleichzeitig milder als die meisten Detergenzien, so daß die Proteine nach seiner Entfernung (z.B. über Dialyse) wieder vollständig

renaturieren können. In Harnstoff gelöste Membranproteine sollten also, mit großer Wahrscheinlichkeit, bei einer Dialyse zusammen mit Liposomen aus Gehirnlipiden wieder "aktive" Membranvesikel ausbilden können, deren Bindungsfähigkeit an retinale Neurite erhalten wäre. Zudem wäre eine Fraktionierung der Membrankomponenten vor der Rekonstitution in solche Vesikel denkbar, z.B. durch Gelchromatographie. Vorversuche zeigten außerdem, daß unter besonderen Bedingungen (s. unten) bei der Solubilisierung von Zellen in Harnstoff die Zellkerne intakt bleiben und leicht abgetrennt werden können.

Die im folgenden "Rohvesikel" genannten Membranvesikel werden folgendermaßen hergestellt:
Maximal 20 Tecta E9 oder E10 werden wie üblich präpariert und in 15 ml hypotonem Homogenisationspuffer (10 mM Tris-Puffer, pH 7,4; 1.5 mM $ZnCl_2$; 1 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O; 1 mM Spermidin-HCl; nach Halfter, 1983, verändert), versetzt mit 2 µl/ml Protease-Inhibitor Aprotinin (Sigma) und homogenisiert (Potter- Homogenisator mit L-Stempel). Das Homogenat wird niedertourig abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Sediment noch einmal in 15 ml obigen Puffers homogenisiert; danach wird wieder zentrifugiert, und das Sediment weiterverarbeitet. Bei dieser Prozedur wird ein großer Teil der zytosolischen Proteine entfernt, die in dem großen Überschuß Homogenisationspuffer löslich sind. Allerdings schnüren sich bei der Homogenisation der Zellen sofort Membranvesikel ab, die in ihrem Inneren stets Teile des Zytosols enthalten. Das Sediment aus Kernen und Membranvesikeln wird nun in 4 M Harnstoff in PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} und 2 mM Spermidin 1 Std. lang bei 4°C extrahiert. Pro Tectum werden 150 µl Harnstoffpuffer

verwendet. Die Probe wird in regelmäßigen Abständen auf einem Vortex geschüttelt. Nach 1 Std. kann von den Kernen abzentrifugiert werden (30 min, 9 000 x g = 12 000 rpm HB4-Rotor). Der leicht opaleszierende Überstand wird über Nacht gegen PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} dialysiert. Dies geschieht am besten in einer rotierenden Apparatur mit kleinen Dialysekammern von 400 µl Inhalt (Eigenbau), um Vesikel von möglichst einheitlicher Größe zu erhalten.

Abb. 12 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von fixierten und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastierten Rohvesikeln. Das Aussehen der Membranvesikel entspricht in etwa dem der durch Zentrifugation gewonnenen Membranen (s. Halfter, 1983), die Rohvesikel sind jedoch insgesamt kleiner und von gleichmäßigerer Größe.

Abb.12: Präparation von Rohvesikeln; Betrachtung im Transmissions-Elektronenmikroskop. Die Vesikel wurden fixiert, in einem Eppendorf-Cup pelletiert, und das Pellet auf einem Ultramikrotom geschnitten. Kontrastiert mit Uranylacetet und Bleicitrat. Vergrößerung 30000x.

Bestimmung des Anreicherungsfaktors der Membranproteine

In Anlehnung an Halfter, 1983, wurde die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase, eines nur in der Plasmamembran vorkommenden Enzyms, zur Ermittlung des Anreicherungsfaktors herangezogen. Gegenüber einer Vergleichsprobe von Tectumhomogenat von gleicher Proteinkonzentration wiesen Rohvesikel eine ebenfalls vierfach höhere Phosphatase-Aktivität auf. Für diesen Test waren die Vesikel allerdings nur 6 Std. lang dialysiert worden, da die alkalische Phosphatase mit der Zeit an Aktivität verlor. Die Gesamtausbeute der Membranpräparation beträgt ca. 10 % des ursprünglichen Zellproteins.

Adhäsion der Rohvesikel an retinale Axone auf Collagen

Die wie beschrieben gewonnenen und mit RITC angefärbten (Halfter, 1983) Rohvesikel binden an retinale Axone, die auf Collagen-beschichteten Petriperm-Schalen kultiviert wurden, ganz wie die über differentielle Zentrifugation erzeugten Tectummembranen (Bindungstest: s. Halfter, 1983). Dabei zeigt sich auch hier ein Stufengradient zwischen nasalen und temporalen Fasern: Die Vesikel "kleben" stärker und dichter an nasalen Axonen (Abb. 13).

Kontrollversuch: Bindung von Rohvesikeln aus Vorderhirn an Retina-Neurite

In einem Parallelversuch sollte geprüft werden, ob die Bindung von Rohvesikeln an retinale Axone tatsächlich spezifisch für Tectummembranen ist. Dazu wurden mit der beschrie-

benen Prozedur Rohvesikel aus Vorderhirn-Gewebe E9 hergestellt. Im Einklang mit den Ergebnissen von Halfter 1983 binden solche Vesikel kaum an retinale Neurite (Abb. 14).

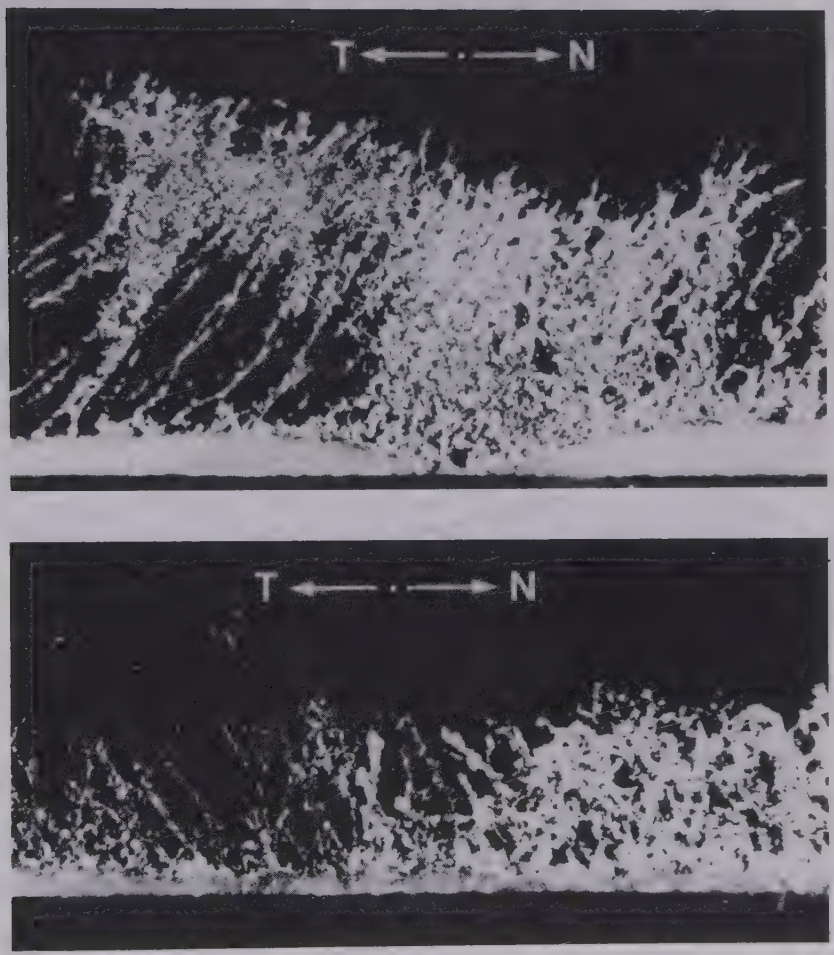

Abb.13: Bindung von Rhodamin-gefärbten Rohvesikeln auf retinalen Axonen in Kultur, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Abgebildet sind zwei Explantatstreifen aus zwei verschiedenen Versuchen. N: Nasale, T: Temporale Axone.

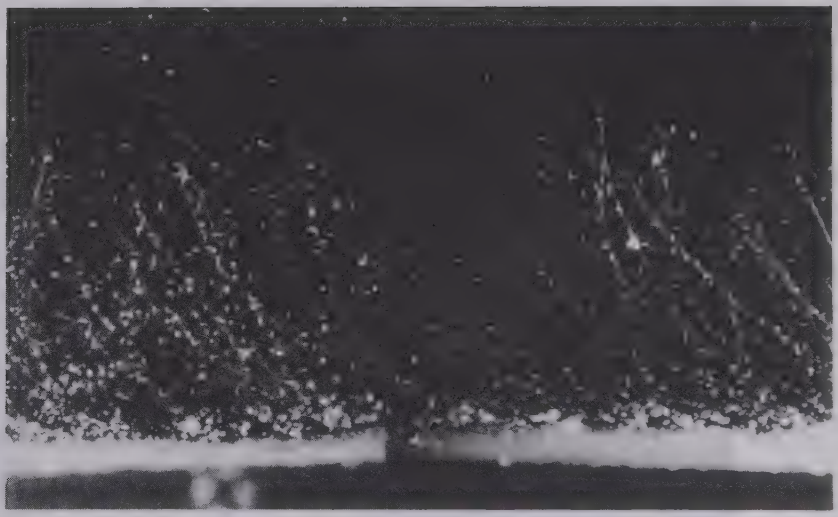

Abb. 14: Kontrollversuch: Rohvesikel aus Vorderhirn binden kaum an retinale Fasern in Kultur auf Kollagen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme.

Bindung von Rohvesikeln aus Tectum an retinale Axone auf Laminin

Laminin stellt - neben Basalmembran aus Retina - das beste Wachstumssubstrat für retinale Fasern dar. Ein Vorteil der Explantation von Retina-Streifen auf Laminin anstatt Collagen liegt darin, daß die Axone auf einer zwei-dimensionalen Unterlage für Vesikel besser zugänglich sind als im dreidimensionalen Collagen-Geflecht. Für alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb Explantate auf Laminin verwendet.

Die Adhäsion von Rohvesikeln an retinale Fasern auf Laminin als Substrat unterscheidet sich stark von dem Bild, das man auf Kollagen- Explantaten erhält. Bei Laminin- Explantaten konnte kein naso- temporaler Stufengradient festgestellt werden, die Vesikel- Bindung war für die ganze Retina annähernd gleich gut. Dem entspricht, daß die nasalen und die temporalen Fasern auf Laminin auch keinen Unterschied im Wachstumsverhalten zeigen, während auf Collagen die temporalen Fasern gebündelter und meist etwas länger auswachsen (siehe dazu auch Abb. 13 und Claviez, 1981). Vielleicht hat die stärkere Bündelung der temporalen Fasern auf Collagen etwas mit ihrer verminderten Fähigkeit zur Vesikelbindung zu tun. Auf dem im Vergleich zu Laminin etwas schlechterem Substrat Collagen spielt anscheinend die Faser-Faser-Wechselwirkung besonders der temporalen Axone eine größere Rolle als auf Laminin, wo die Faser-Substrat-Adhäsion dominiert.

Fraktionierung der Rohvesikel über präparative Elektrofokussierung

Versuche, den 4 M- Harnstoffextrakt des Tectums vor der Rekonstitution zu Vesikeln über eine Gelchromatographie an diversen Sephadex-Materialien (G75, G100, G150) in verschiedene Molekulargewichts-Fraktionen aufzutrennen, sind immer wieder gescheitert. Der überwiegende Teil der aufzutrennenden Proteine fand sich stets im Totvolumen der Säule wieder, selbst nach Erhöhung der Molarität der Harnstofflösung auf 8 M. Offensichtlich handelt es sich bei dem leicht opaleszierenden Überstand der 9 000 g-Zentrifugation nicht um eine "echte" Protein-Lösung; eventuell liegen die Lipide als Micellen vor, und die Proteine sind teilweise über hydrophobe Wechselwirkung an diese Micellen assoziiert. Im elektrischen Feld (z.B. bei einer Elektrofokussierung) sind die Proteine jedoch offensichtlich beweglich und von den Lipiden abzutrennen (siehe die 2D-Gele).
Beobachtungen von A. Goverdhan (persönl. Mitteilung) zufolge lassen sich die Micellen aus dem Harnstoffextrakt bei höheren g-Werten abzentrifugieren. Für alle weiteren Fraktionierungsversuche der Rohvesikel wurden diese daher nicht über Dialyse, sondern über Zentrifugation bei ca. 200 000 x g gewonnen. Für Adhäsionsversuche solcher Vesikel an retinale Neurite ist jedoch die Dialyse vorzuziehen, da damit einheitliche Vesikel entstehen, während sich das Pellet der 200 000 g-Zentrifugation kaum mehr resuspendieren läßt (außer durch schädliches Beschallen mit Ultraschall hoher Leistung).
Im Überstand der 200 000 g-Zentrifugation ist fast das ganze Spektrum der Tectum-Proteine enthalten, wenn auch in geringer

Konzentration, wie aus 2D-Gelen ersichtlich ist. Mit den Liposomen sedimentiert dagegen offensichtlich nur eine Subklasse von Proteinen, die auf noch ungeklärte Weise besonders stark mit den Membranlipiden verbunden sind.

Aus der Beobachtung, daß die Rohvesikel sich zwar nicht über einfache Chromatographie auftrennen lassen, wohl aber bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese, entwickelte sich die Idee, eine Fraktionierung der Vesikel über eine präparative Elektrofokussierung zu versuchen. Ein Ersatz des Harnstoffs durch nicht-ionische Detergenzien kommt auch hier nicht in Frage, da diese aus den Lipid-Micellen nur schwer vollständig zu entfernen sind.

Ein entscheidender Punkt an der nachfolgend beschriebenen präparativen Fokussierung ist, daß der pH-Bereich, in dem jeweils die interessanten Proteine erwartet werden, trägerfrei bleibt. Dadurch ist zwar in diesem Bereich eine saubere Trennung in schmale Banden nicht zu erwarten; die Viskosität von 8,5 M Harnstoff reicht nicht aus, um Diffusion und Konvektion restlos zu unterdrücken. Andererseits ist die Rückgewinnung der entsprechenden Proteine und die Rekonstitution in Vesikel dadurch wesentlich vereinfacht. Eine elektrophoretische Elution der Proteine aus einem Acrylamid-Gel ist ohnehin schwierig, besonders wenn sich die Proteine an ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt befinden. Eine Auftrennung in Einzelproteine war zunächst auch noch nicht beabsichtigt, sondern lediglich eine Fraktionierung der Rohvesikel in wenige Untereinheiten.

Durchführung der präparativen Elektrofokussierung

Die Auftrennung der Rohvesikel wird zweckmäßig in Rundgelen vollzogen. Wie im Anhang beschrieben, wird je nach Bedarf die Hälfte bis Dreiviertel der Röhrchen mit Gel gefüllt. Das Gel mit den darin aufgetrennten Proteinen wird später verworfen. Der Oberteil der Röhrchen wird mit Rohvesikeln gefüllt, die in Harnstofflösung suspendiert sind, welche in ihrer Zusammensetzung, mit Ausnahme des fehlenden Acrylamids, dem Gel im unteren Teil des Röhrchens entspricht.
Mit dieser Anordnung lassen sich sowohl eine isoelektrische Fokussierung (IEF) wie eine Nichtgleichgewichts-Fokussierung (NEPHGE) durchführen. Bei der NEPHGE können anschließend die Proteine mit saurem, bei IEF diejenigen mit basischem isoelektrischem Punkt rückgewonnen werden. Beide Fokussierungsarten wurden zunächst unter nicht- reduzierenden Bedingungen angewendet. Während der Fokussierung lösen sich die am Anfang noch gut sichtbaren Rohvesikel auf und bilden in definierten Bereichen der trägerfreien Harnstofflösung neue Vesikelbanden. Ein Teil der ursprünglich in den Rohvesikeln vorhandenen Proteine bleibt auch unter diesen Bedingungen mit den neu gebildeten Vesikelbanden assoziiert (s. unten), während ein anderer Teil in die Gelmatrix wandert, dort fokussiert und anschließend mit Coomassie Blue angefärbt werden kann.

Eine Steuerung der Fraktionierung ist über verschiedene Parameter möglich:

- Wahl zwischen IEF und NEPHGE
- Verschiedene Volt-Stunden-Werte der Fokussierung
- Variation der Länge des trägerfreien Bereichs des Röhrchens

Die Ergebnisse von IEF und NEPHGE sehen folgendermaßen aus:

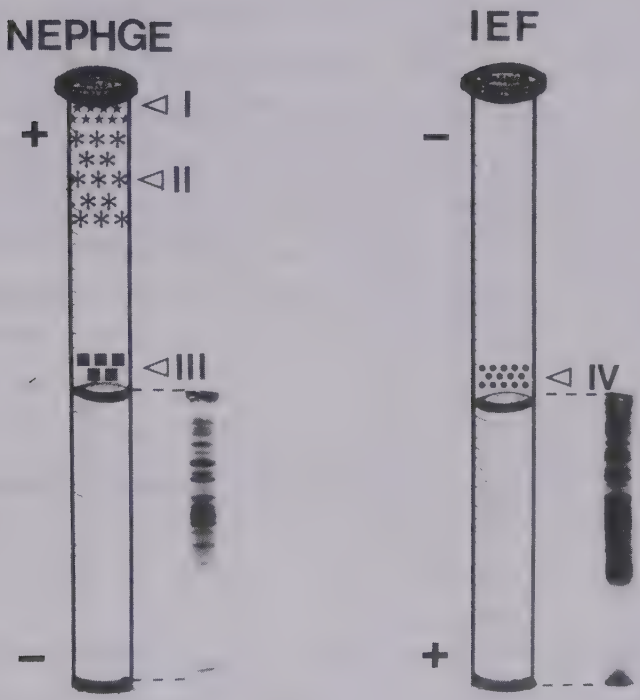

Abb.15: Schematische Darstellung der Präparativen Elektrofokussierung der Rohvesikel: Mit römischen Ziffern sind die sich "natürlich" bildenden Vesikelbanden gekennzeichnet. Der obere Teil des Röhrchens besteht aus flüssiger Phase, der untere ist mit Gel gefüllt. Die Coomassie- Färbung des Gelbereichs ist rechts daneben abgebildet.

Bei der NEPHGE bilden sich am sauren Ende des Gels drei, allerdings nicht klar gegeneinander abgegrenzte "Banden" von Vesikeln aus. Bei der IEF ist es nur eine, im leicht alkalischen Bereich. Die bei der NEPHGE sichtbaren sauren Vesikel wandern bei der IEF durch das Gel hindurch und fokussieren nicht.

Neben den sich "natürlich" bildenden Vesikeln lassen sich auch noch "künstliche" Vesikel herstellen. Dazu werden die Vesikel von der trägerfreie Phase abzentrifugiert, und die Proteine aus dem Überstand in Lecithin-Liposomen eingebaut (siehe Anhang). Außerdem können die natürlichen Vesikel mit den in der trägerfreien Phase befindlichen Proteinen zusammen rekonstituiert werden, wodurch sich Vesikel ergeben, die entweder alle sauren oder alle basischen Proteine der Rohvesikel enthalten. Alle Fraktionen werden vor einer weiteren Verwendung über Nacht gegen PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} dialysiert.

Adhäsion der verschiedenen Vesikelfraktionen an retinale Axone

Die über die IEF hergestellten, leicht alkalischen "natürlichen" Vesikel (IV, s.o.) binden ebensowenig an retinale Fasern in Kultur wie Lecithin-Vesikel, die den gesamten basischen Teil der Proteine aus den Rohvesikeln enthalten.

Anders dagegen die sauren, durch NEPHGE gewonnenen Vesikel: Für die ersten Versuche wurden nur die beiden oberen, sauren Banden I und II mit dem Rest der trägerfreien Phase zusammen 1 Std. lang auf dem Vortex geschüttelt und anschließend dialysiert. Die erhaltenen Vesikel binden genau wie Rohvesikel an Retina- Neurite auf Laminin (Abb. 16). Wurde vor der Dialyse die Vermischung der natürlichen, sauren Vesikel mit dem Rest der trägerfreien Phase unterlassen, dann binden die resultierenden Vesikel dagegen kaum an Retinafasern. Der

naheliegende Schluß, daß die "aktive Komponente" unter den wenigen in der trägerfreien Phase befindlichen Proteinen zu suchen wäre (s.u.), ließ sich nicht bestätigen. Wie nachfolgende Versuche zeigten, war wahrscheinlich das geringe spezifische Gewicht der natürlichen Vesikel für die schwache Bindung an Axone verantwortlich; der Lipid- Anteil dieser Vesikel dürfte weit über 90 % liegen, und sie bleiben deshalb im Kulturmedium über den Fasern ständig in der Schwebe. Diese Erklärung wird gestützt durch die Tatsache, daß auch Lecithin-Vesikel mit den Proteinen der trägerfreien Phase nicht binden, sowie dadurch, daß die Beimengung von den dialysierten und lyophilisierten Proteinen der trägerfreien Phase eine Bindung von Rohvesikeln an Fasern nicht inhibieren konnte. Die Adhäsionsfähigkeit der natürlichen sauren Vesikel wurde jedoch wiederhergestellt (entsprechend Abb. 16), wenn diese vor der Dialyse mit einem Überschuß an Rinderserum-Albumin versetzt wurden, wodurch sich ihr spezifisches Gewicht erhöhte. Albumin wurde gewählt, weil es die Bindung der Vesikel an Retinafasern kaum beeinflussen dürfte, im Gegenteil, es wird normalerweise zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung herangezogen.

Aus diesen Versuchen ist also ersichtlich, daß die für die Bindung an retinale Neurite entscheidenden adhäsiven Komponenten der Tectummembranen unter den sauren und gleichzeitig besonders lipophilen Proteinen zu suchen sind. Eine weitere Auftrennung der Vesikelbanden I und II erscheint daher vielversprechend.

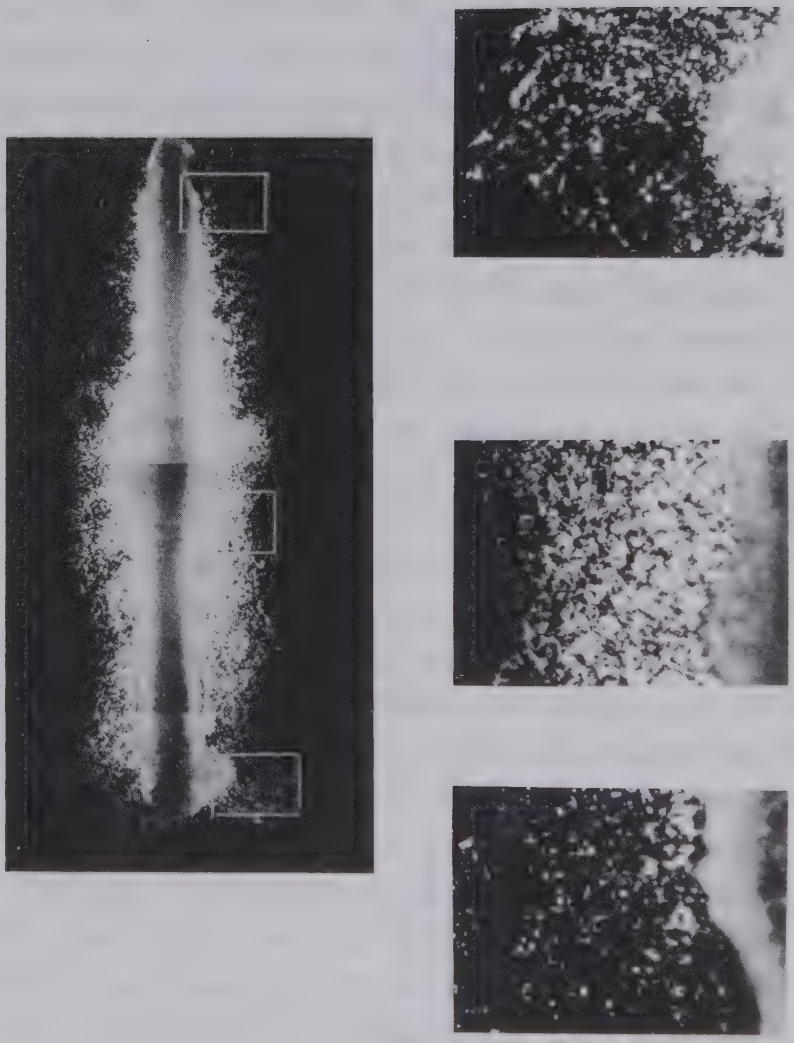

Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vesikeln, die nach präparativer Fokussierung aus den Banden I und II der NEPHGE und dem Rest der trägerfreien Phase rekonstituiert wurden und hier an retinalen Fasern in Laminin- Explantat-Kultur adhärieren. Rechts Ausschnittvergrößerungen.

Gelelektrophoretische Analyse der verschiedenen Vesikel-Fraktionen

Durch eine gelelektrophoretische Analyse der einzelnen Vesikel- Präparationen kann deren unterschiedliches Verhalten im biologischen Test mit biochemischen Daten korreliert werden. In Abb. 17 sind 2D- Gele einiger wichtiger Vesikel- Aufarbeitungen zusammengestellt:
Während nach der IEF, wie erwartet, sich in der trägerfreien Phase nur neutrale bis basische Proteine befinden, ist durch die NEPHGE die zu erwartende Abtrennung der basischen Proteine nicht vollständig; an die "natürlich" entstehenden Vesikel bleiben auch einige basische Proteine assoziiert. Allerdings kann die Nichtgleichgewichts- Fokussierung nicht beliebig verlängert werden, weil der pH- Gradient schrittweise zusammenbricht. Deshalb sind hier noch Experimente zur Ermittlung der optimalen Voltstunden- Werte durchzuführen.

Von den natürlichen" sauren Vesikeln (I) ist Aktin (mit "a" symbolisiert) fast vollständig abgetrennt worden. In allen anderen Vesikel-Banden der NEPHGE ist Aktin dagegen vorhanden, angereichert in Bande II (nicht gezeigt).

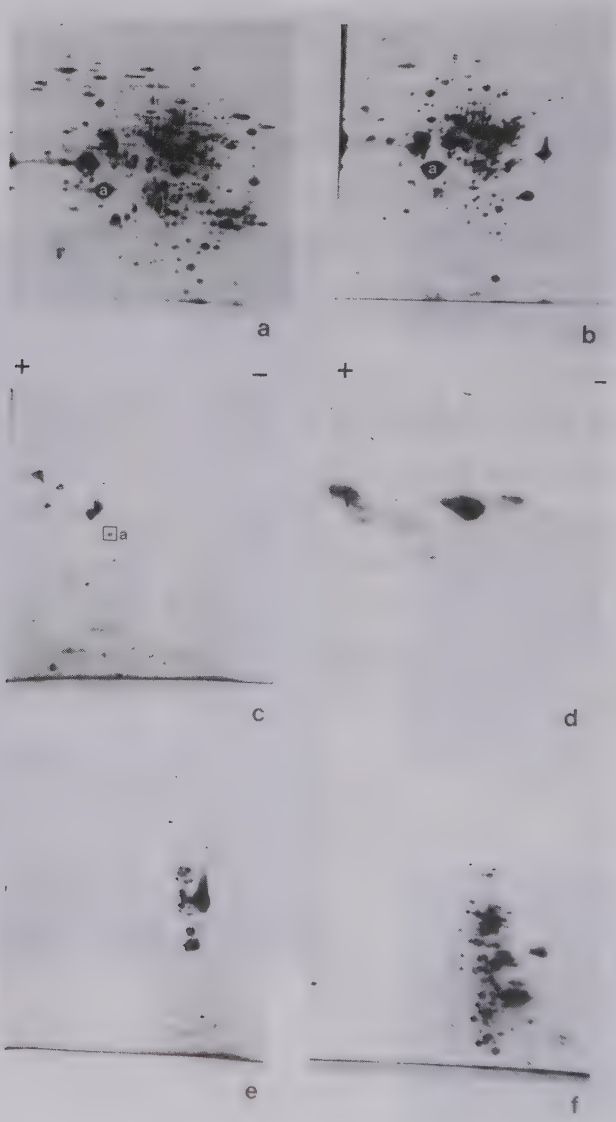

Abb.17: 2D-Gele von: a) Tectum- Homogenat zum Vergleich; b) Rohvesikel von Tectum, Pellet der 200000 g-Zentrifugation; c) Sauerste "natürliche" Vesikelbande (I) der NEPHGE; d) Flüssige Phase der NEPHGE, ohne "natürliche" Vesikel banden I,II,III; e)Leicht basische "natürliche" Vesikelbande (IV) der IEF, 10000 Vhr; f) Lecithin- Vesikel der trägerfreien Phase der IEF (ohne e), 10000 Vhr.

Um zu prüfen, ob es sich bei der Vesikelpräparation auch wirklich um eine Anreicherung von Membranproteinen handelt, bietet sich natürlich die in Kap. 1 beschriebene Zelloberflächen- Markierung mit Biotin-X-NHS an.
20 Tecta E10 wurden mit insgesamt 5 mg Biotin-X-NHS markiert, und von den (nur relativ schwach biotinylierten) Tecta Vesikel präpariert, die dann auf 2D-Gelen analysiert wurden (Abb.18).
Man sieht, daß bereits die Rohvesikel zu einem großen Teil aus biotinylierbaren Membranproteinen bestehen; viele Spots von a) sind auf b) wiederzuerkennen. Durch die Elektrofokussierung findet dann eine weitere Anreicherung bestimmter Membranproteine statt: die beiden Blots b) und d) unterscheiden sich nur geringfügig in ihrem Muster (auffällig hier nur der Unterschied im sauren und hochmolekularen Bereich), während von den Rohvesikeln zu den Vesikeln nach präparativer NEPHGE die Gesamtzahl der einzelnen Proteine stark abnimmt. Beide Vesikelpräparationen enthalten jedoch auch nicht-biotinylierbare (und damit wahrscheinlich Nicht-Membran-) Proteine wie Aktin. Vermutlich werden diese während der Vesikelbildung in das Lumen der Lipid- Micellen eingelagert.

Dieser Test ist insofern bedeutungsvoll, als damit gezeigt werden kann, daß die Membranvesikel zum größten Teil aus Plasmamembran- Komponenten gebildet werden, und nicht zum Beispiel aus Membranen des Golgi- Apparates oder der Mitochondrien.

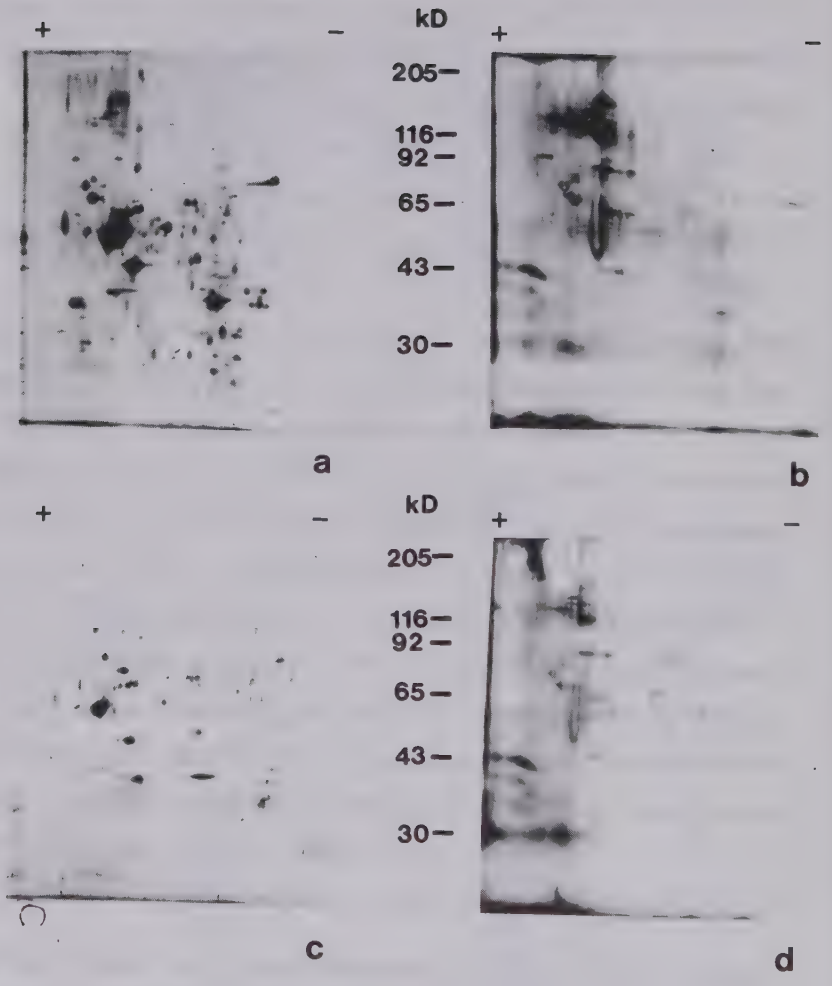

Abb. 18 a - d: Vergleich zwischen einer Gesamtprotein-Färbung und einer Streptavidin- Färbung auf biotinylierbare Proteine in zwei verschiedenen Vesikelpräparationen. a) und c) zeigen mit kolloidalem Gold gefärbte Blots von 2dimensionalen Gelen der Vesikel; für b) und d) wurden Parallel- Blots zu a) und c) mit ^{35}S-Streptavidin, 1: 1500 verdünnt, inkubiert, getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert. Bei a) und b) handelt es sich um Rohvesikel. Bei c) und d) waren Vesikel aus der flüssigen Phase der NEPHGE plus die "natürlichen" Banden I und II rekonstituiert worden.

DISKUSSION

Die Wechselwirkung zwischen den Membranoberflächen verschiedener Zelltypen untereinander sowie mit der extrazellulären Matrix spielt für die Entwicklung hochkomplexer Muster von Zellverbänden während der Embryogenese eine wichtige Rolle. Für ein Verständnis der Entstehung der retinotectalen Projektion beim Hühnchen, die hier als Modell für die Entwicklung des Zentralnervensystems überhaupt herangezogen wird, gilt es die Strukturen zu studieren, an denen sich die retinalen Axone vom Moment ihres Auswachsens aus den Ganglienzellen an bis zur Synaptogenese im Tectum orientieren können. Den an diesem Vorgang beteiligten Molekülen kann dabei eine mehr oder weniger mechanische Leitfunktion zukommen, oder sie können Teil eines spezifischen Erkennungs- und Orientierungssystems sein.
Mit der beschriebenen Biotin- Markierung der Plasmamembran-Oberflächen steht nun eine Methode zur Verfügung, um die Gesamtheit all dieser Moleküle biochemisch zu analysieren, und darüberhinaus auch zu isolieren. Bisher waren Membranoberflächen- und Extrazellulärmatrixmoleküle meist unter Zuhilfenahme einzelner monoklonaler Antikörper untersucht worden, deren Bildung bei einer mehr oder weniger gezielten Immunisierung mit Membran- Antigen in gewisser Hinsicht dem Zufall unterliegt. Für die letztgenannte Methode spricht natürlich, daß sich das Auftreten bzw. Verschwinden, oder eine Änderung in der räumlichen Verteilung bestimmter, einzelner Moleküle mit einem monoklonalen Antikörper gut verfolgen lassen, während die Biotinmarkierung mit anschließender

gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben eine Fülle zunächst nicht oder nur schwer auszuwertender Daten über weitgehend unbekannte Proteine liefert. Andererseits ist es sinnvoll, zunächst mit einer "groben" Analyse aller evtl. beteiligten Moleküle zu beginnen, um dann nach einzelnen, besonders interessant erscheinenden Komponenten zu suchen.

Eine Alternative zur Biotin- Markierung wäre die Jodierung von Zelloberflächen nach Bolton und Hunter; diese ist jedoch umständlicher und auch riskanter in der Durchführung und resultiert in einer vergleichsweise schlechteren Auflösung bei zweidimensionalen Gelen. Nicht zuletzt deshalb wurde sie für eine Untersuchung der Embryonalentwicklung der retinotectalen Projektion beim Hühnchen meines Wissens noch nie angewandt, zumal sie sich auch nicht für eine Isolierung der markierten Proteine eignet.
Demgegenüber stellt die Analyse und Anreicherung von Membrankomponenten mit verschiedenen Lektinen eine wirkliche Alternative zur Biotinylierung dar, wenn man -zu Recht- davon ausgeht, daß ein Großteil der Zelloberflächenproteine glykosiliert vorliegt. Zur Erfassung der Gesamtheit aller glykosilierten Membrankomponenten ist ein einzelnes Lektin nicht ausreichend, dafür wäre eine unbekannte Anzahl verschiedener Agglutinine notwendig. Wo jedoch die Isolierung von Subfraktionen der Plasmamembran- Bestandteile gewünscht wird, läßt sich diese Methode mit gutem Erfolg anwenden (siehe z.B. Rathjen et al., 1987). Was die gelelektrophoretische Analyse von Membranen betrifft, stellt die Lektinbindung ein brauchbares Hilfsmittel dar, wenn ausreichend große Probenmengen zur Verfügung stehen. Eine Untersuchung von in Kultur gezüchteten retinalen Neuriten war mit dieser Technik beispiels-

weise nicht möglich, da die Bindung von Lektinen an Proteine auf einem Nitrocelluosefilter ein relativ schlechtes Signal-Rausch- Verhältnis aufweist (persönliche Beobachtung), verglichen mit dem Nachweis biotinylierter Proteine auf derartigen Blots.

Mit geringfügigen Veränderungen läßt sich auch die Biotinmarkierung für eine Analyse oder eine Isolierung von Teil-Fraktionen der Plasmamembranen einsetzen. So werden z.B. bei der Reaktion von Zellen oder Geweben mit Maleimido- Butyryl-Biocytin (MBB) nur schwefelhaltige Proteine markiert, wobei die Bedingungen so gewählt werden können, daß eine Unterscheidung zwischen Cystin- und Cystein- Gruppen möglich ist. Die Untersuchung speziell der schwefelbrücken-haltigen Proteine verspricht z.B. deshalb interessant zu sein, weil unter diesen auch etwa die "Major Histocompatibility Complex"-Proteine und der T- Cell- Rezeptor zu finden sind, die ihrerseits Determinanten für die Erkennung von Zellen des Immunsystems untereinander sind.

Glykoproteine lassen sich spezifisch mit Biotin- Hydrazid nachweisen, wobei die Zelloberflächen jedoch zuvor mit Perjodat oxydiert werden müssen. Solcherart isolierte Moleküle können dann nur noch unter Vorbehalt für biologische Tests verwendet werden.

Wie beschrieben, erhält man bei der affinitätschromatographischen Reinigung der biotinylierten Oberflächenproteine an Avidin- Agarose zwei verschieden zusammengesetzte Fraktionen. Durch die Wahl anderer als des verwendeten Laufpuffers werden sich mit großer Wahrscheinlichkeit noch andere Fraktionierungen erzielen lassen. Bei Ersatz des Desoxycholats im Laufpuffer durch eine Mischung von 2,5% Zwittergent-314 und 2,5%

Nonidet- P40 z.B. wird nicht mehr der überwiegende Teil der markierten Proteine mit Biotin spezifisch von der Säule eluiert, sondern etwa die Hälfte muß mit Glycin- HCl pH 2.0 eluiert werden (W. Dreyer, persönl. Mitt.).
Zur weiteren Auftrennung der isolierten Proteine kann sich z.B. eine Gelchromatographie mit Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie anschließen (J.F. Kayyem, in Vorbereitung).

Für die Biotin- Markierung bieten sich neben den rein analytischen Arbeiten, für die schon Beispiele beschrieben wurden, vielfältige Anwendungsmöglichkeiten an. So wurde bereits damit begonnen, gegen affinitätschromatographisch isolierte Membrankomponenten des E8- Tectums monoclonale Antikörper zu erzeugen, in der Hoffnung, mit dieser Technik für die retinotectale Projektion und besonders für die Verschaltung der Fasern im Tectum entscheidende Moleküle aufzuspüren (W. Dreyer, J. Roman, J.F. Kayyem, E. de la Rosa, U. Schwarz; in Vorbereitung).
In Kap. 1 ist gezeigt worden, wie sich Unterschiede in der Membranzusammensetzung - hier des Tectums- im Laufe der Embryogenese herausarbeiten lassen. Auf dieser Basis wäre es denkbar, bestimmte Moleküle, die z.B. im Laufe der Entwicklung neu auftreten oder verschwinden, durch präparative Gelelektrophorese anzureichern, um dann monoklonale oder sogar polyklonale Antikörper dagegen zu erzeugen, mit denen sich die räumliche Verteilung und vielleicht auch die Funktion der betreffenden Moleküle untersuchen ließen.

Eine Injektion von aktivierten Biotin- Estern zu verschiedenen Zeitpunkten in die Retina läßt sich nicht nur zum Studium des Faserverlaufs zum Tectum benützen (Halfter, 1987), sondern verspricht auch durch simple gelelektrophoretische Analyse interessante Aufschlüsse über die Proteinzusammmensetzung der Axone in verschiedenen Abschnitten ihres Weges zum Ziel zu liefern.

Schließlich ist auch daran gedacht, isolierte Membranmoleküle in biologischen Tests zu verwenden. Zum einen könnten die isolierten Tectum- Membranproteine auf ihre Eignung als Wachstumssubstrat für retinale Axone geprüft werden (siehe Rathjen *et al.*, 1987). Zum anderen sollten sich mit diesen Molekülen Liposomen aufbauen lassen, mit denen man Bindungsstudien an *in vitro* gezüchteten retinalen Axonen (ähnlich den in Kap. 2 beschriebenen) durchführen könnte. Hier sind allerdings Schwierigkeiten zu erwarten. In vorgeschalteten Testreihen müßte zunächst einmal die Frage geklärt werden, ob die Adhäsivität der Tectum- Membranoberflächenproteine durch die Biotinylierung nicht leidet. Vor allem dürften jedoch die mit der beschriebenen Affinitätschromatographie gewonnenen äußerst geringen Materialmengen eine Schwierigkeit darstellen. Für einen Adhäsionstest der affinitätschromatographisch hergestellten Liposomen an Retina- Neurite *in vitro* müßte das ganze Testsystem miniaturisiert werden. Da einzelne Explantatstreifen in Kultur immer wieder unterschiedlich gutes Faserwachstum und auch verschieden starke Adhäsivität für Membranvesikel zeigen, ist eine Standardisierung der Versuche dann äußerst kritisch.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde versucht, die adhäsiven Membrankomponenten des Tectums noch auf einem anderen Wege anzureichern. Die in Kap. 2 beschriebene Herstellung von Membranvesikeln beruht im Wesentlichen auf der guten Solubilisierung von embryonalen Plasmamembranen durch Harnstoff-Lösungen, wobei die adhäsiven Membrankomponenten nach Entfernung des Harnstoffs offensichtlich ihre Aktivität behalten. Die Gewinnung der Vesikel ist einfach und ohne größeren Zeitaufwand durchzuführen, und es lassen sich vielfältige kleinere Abänderungen des Verfahrens denken, wie Änderung der Harnstoffkonzentration, Zusatz von Detergentien, Mercaptoethanol oder EDTA, um die Anreicherung bestimmter Moleküle zu steuern.
Durch die präparative Fokussierung der Roh- Vesikel ist eine Reduktion der auf Gelen anfärbbaren Proteine auf eine Gesamtzahl von etwa noch 20 - 30 pro Fraktion gelungen. Die adhäsiven Proteine überstehen anscheinend auch diese Prozedur ohne allzu großen Aktivitätsverlust, obwohl die Herstellung der Vesikel auf diese Weise mehr als 48 Stunden in Anspruch nimmt. Allerdings sind die entscheidenden adhäsiven Komponenten auch nach einer Fixierung in Glutaraldehyd noch aktiv (Halfter, 1983), sind also offensichtlich recht widerstandsfähig.

Durch die Möglichkeit, alle Schritte der Anreicherung durch zweidimensionale Gelelektrophorese einerseits und den <u>in vitro</u>- Adhäsionstest andererseits zu verfolgen, stellt das Verfahren eine nützliche und sinnvolle Kombination zwischen Biochemie und Biologie dar. Es besteht große Hoffnung, in naher Zukunft adhäsive Membranproteine auf 2D- Gelen identi-

fizieren zu können, indem man z.B. die Gele von bindenden und nicht- bindenden Vesikel- Fraktionen miteinander vergleicht. Bei einer Interpretation derartiger Versuche ist natürlich große Vorsicht am Platz, da z.B. die evtl. verschiedene Lipidzusammensetzung der Fraktionen eine Rolle spielen könnte, oder weil es sich bei der gesuchten adhäsiven Komponente um ein Protein handelt, welches nur in verschwindend geringen Mengen in der Membran vorkommt und von daher auf Gelen nicht zu identifizieren ist. Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit eines kooperativen Effekts mehrerer Proteine; wenn aus den Vesikeln dann z.B. nur eines dieser Bindeproteine herausgelöst wäre, könnte man im biologischen Test keine Bindung mehr beobachten, obwohl vielleicht entscheidende, die Spezifität vermittelnde Bindeproteine noch darin enthalten wären.

Ein nächster Schritt zur weiteren Anreicherung wird sein, das Tectum- Ausgangsmaterial in einen anterioren und einen posterioren Teil aufzuteilen entsprechend dem Projektionsgebiet der nasalen und temporalen Axone der Retina. Zu erwarten wäre, daß zumindest die temporalen Fasern zwischen anteriorem und posteriorem Tectum unterscheiden können (siehe Bonhoeffer & Huf, 1982).

Daneben können die Bedingungen der präparativen Fokussierung noch verändert werden, z.B. durch Zufügen von Mercaptoethanol bei der Solubilisierung der Rohvesikel. Inwieweit die Einbettung der adhäsiven Proteine in ihre natürliche Lipid-Umgebung von Bedeutung ist, soll durch Extraktion der Lipide und Ersatz derselben z.B. durch Lecithin bei der Vesikel-Rekonstitution geklärt werden. Die Entfernung der Lipide aus den entsprechenden Vesikelfraktionen dürfte sich jedoch

schwierig gestalten, da die adhäsiven Proteine durch Kontakt mit organischen Lösungsmitteln irreversibel geschädigt werden könnten.
Schließlich gilt es noch zu untersuchen, auf welchen Zelltypen des Tectums die im Membranadhäsionstest aktiven Proteine vorkommen, da alle bisher beschriebenen Versuche immer mit einer Mischung aller Tectum- Zellen als Ausgangsmaterial durchgeführt wurden. Dazu könnten Antikörper gegen eine hochangereicherte adhäsive Vesikel- Fraktion dienen, womit eine Zuordnung bestimmter Flecken auf 2D- Gelen zu bestimmten Zelltypen möglich wäre.

Die hier vorgestellten Untersuchungsmethoden bilden einen Ansatz, die in biologischen Testsystemen beobachteten Eigenschaften embryonaler Zellmembranen, insbesondere die Adhäsivität bestimmter Membranen füreinander, biochemisch näher zu charakterisieren. Durch die Kombination mit immunologischen und anderen Methoden wird es vielleicht gelingen, die in vitro gewonnenen Daten auf ihre Bedeutung für die Situation auch im Embryo zu prüfen.

ANHANG

MATERIAL UND METHODEN

A) Zellkultur

1. Versuchstiere: Hühner

Die Bebrütung der verwendeten Hisex- White Leghorn- Eier erfolgte bei 38 °C und 65% Luftfeuchtigkeit; sie wurden alle 6 Stunden gewendet. Das Alter der Embryonen ist in Tagen angegeben, E10 entspricht z.B. einer Bebrütungsdauer von 10 Tagen. Die Entwicklung der Embryonen verläuft unter den genannten Bedingungen geringfügig schneller als in der Natur.

2. Seren und Medien für die Zellkultur

Eine Zusammenstellung findet sich bei Claviez, 1981 sowie bei Halfter, 1983.

3. Präparation von Retinae und Tecta

Die Präparation von Retinae für die Explantation erfolgte wie bei Claviez, 1981, beschrieben.
Tecta der angegebenen Altersstufen wurden zunächst durch Einschneiden der Hirnhaut freigelegt, herausgeschnitten, in Hanks`Medium transferiert und sorgfältig von anhaftenden Resten der Hirnhaut sowie des optischen Trakts befreit.

4. Herstellung von Retina- Explantaten

4.1 Die Herstellung des Rattenschwanz- Kollagens und der damit beschichteten Petripermschalen (Heraeus, Hanau) wurde durchgeführt wie bei Halfter, 1983, beschrieben, ebenso die Explantation von Retina- Streifen.

4.2 Zur Beschichtung der Petriperm- Schalen mit Laminin wurden die Schalen unter sterilen Bedingungen in einer Bedampfungsanlage (Edwards E12E) bei einem Vakuum von 0,1 Torr und einem Glimmentladungsstrom von 0,4 A beglimmt; dadurch werden Ladungsträger auf der Petripermoberfläche erzeugt. Danach wurden die Schalen mit einer sterilen, wäßrigen Lösung von Poly- L- Lysin (Mol. Gew. 6000-9000; SIGMA, München), 200 ug/ml über Nacht inkubiert, zweimal in PBS gewaschen, und schließlich mit Laminin (MEDAC, Hamburg), 20 ug/ml in PBS überschichtet, 3 Std. im Brutschrank belassen und unmittelbar vor der Explantierung der Retina- Streifen einmal mit Kulturmedium gewaschen.

Die Kultur der nach 4.1 oder 4.2 hergestellten Retina-Explantate erfolgte im Gegensatz zu den Arbeiten von Claviez, 1981 und Halfter, 1983 in serumfreiem, "künstlichem" Kulturmedium F12 (GIBCO, Schottland), um anschließende gelelektrophoretische Analysen möglich zu machen.

B) Histologische Techniken

5. Herstellung von Gewebeschnitten für die Licht- und Elektronenmikroskopie

5.1 Lichtmikroskopie: Die betreffenden Gewebe wurden in der Regel je nach Dicke des Gewebes in 4% Paraformaldehyd in Kaliumphosphatpuffer fixiert und anschließend in 25% Sucrose in PBS oder Hanks'A Medium eingelegt, bis sie mit der Lösung isoton waren und sich absetzten. Gefrierschnitte von 10-20 um Dicke wurden auf einem Gefriermikrotom (Reichert- Jung, Nußloch) in dem Einbettungsmittel "Tissue-Tek" (Miles) angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden dann auf mit 0,05% Chromalaun/ 0,5% Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen.

5.2 Elektronenmikroskopie: Die Fixierung der Proben in Karnovsky- Reagenz und 1% OsO_4 in PBS sowie die Einbettung in EPON- Harz mit anschließender Herstellung von Ultradünnschnitten wurde in Anlehnung an Halfter, 1983 durchgeführt. Die Ultradünnschnitte wurden zusätzlich in 2% Uranylacetat und/ oder 1% Bleicitrat kontrastiert.
Vor der Fixierung in OsO_4 wurde im entsprechenden Fall zum Nachweis von Streptavidin im Gewebe, das mit Meerettichperoxidase markiert war, die Reaktion mit 3,3- Diaminobenzidin und H_2O_2 durchgeführt (siehe ebenfalls Halfter, 1983).

C) Gelelektrophorese und Blotting

6. Die ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese im Mikromaßstab wurde ausgeführt wie bereits ausführlich beschrieben (Boxberg, 1984).

Blots wurden in der Regel über Nacht mit einer Lösung von 3-4% PVP (SIGMA, München) in PBS abgesättigt. Zum Nachweis biotinylierter Proteine wurden sie dann 1 Std. lang mit ^{35}S-Streptavidin (Amersham, England), in 0,3% PVP und 0,5% Tween 80 (SIGMA) in PBS 1:1500 verdünnt, inkubiert, 5mal in vorstehender Lösung gewaschen, getrocknet und schließlich auf Röntgenfilm exponiert (Betamax; Amersham). Die Expositionsdauer konnte abgeschätzt werden, wenn die auf dem Blot gebundene Radioaktivität mit einem Handmonitor (Berthold LB1210 B; Wildbad) gemessen wurde: 100 Impulse pro sec. (ips) entsprechen etwa 36 Std. Expositionsdauer, 50 ips 3 Tagen, 25 ips einer Woche.

Eine Gesamtprotein- Färbung auf dem Blot wurde erreicht durch Inkubation des Nitrocellulosefilters mit einer kolloidalen Goldlösung (Janssen, Belgien). Dazu kann ebenfalls die angegebene Absättigung mit PVP Anwendung finden anstelle der vom Hersteller empfohlenen mit 0,3 % Tween 20. Die Goldlösung wird einfach nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität abgegossen, und der Blot vor dem Trocknen noch einmal in PBS gewaschen.

D) Markierung von Geweben und Zellen mit Biotin und Affinitätschromatographie der biotinylierten Moleküle

7. Biotinylierung von Geweben und Zellen:

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur ausgeführt. Das zu markierende Material wurde zunächst zweimal in Markierungspuffer ("Label Buffer", L.B.) gewaschen (L.B.: 8,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 1,0 g Glucose; 0,2 g $MgSO_4$ x7 H_2O; 0,2 g $CaCl_2$ x 2 H_2O; 0,5 g $NaHCO_3$; H_2O dest. ad 1000 ml; pH 7,4). Biotin-X-NHS wurde in wasserfreiem DMSO gelöst (ca. 100 mg/ml); in dieser Lösung bleibt es einige Stunden verwendungsfähig. Pro etwa 10^7 Zellen im ml Suspension oder für 25 mg Gewebe- Feuchtgewicht benötigt man ca. 1 mg Biotin- Reagenz. Die Biotin- DMSO- Lösung wurde meist im Reaktionsgefäß vorgelegt und das zu markierende Material in L.B. dazugegeben, um eine schnelle Durchmischung zu erreichen; das ist wichtig aufgrund der schnellen Hydrolyse des Hydroxysuccinimid- Esters in Wasser, und um für das Gewebe schädliche lokale Überkonzentrationen an DMSO zu vermeiden. Für dickere Gewebe empfiehlt sich eine zweite Zugabe von frischem Reagenz in DMSO nach etwa 5 min. Die Gesamt- Reaktionsdauer richtet sich nach der Dicke des Gewebes: Für Zellen oder z.B. Nervenfasern in Kultur sind 2 min. ausreichend, für Gewebe bis zu ca 100 Zell- Lagen 15 min. Zum Schluß wurde in Eagles'Medium (siehe Claviez, 1981) gewaschen; prinzipiell ist dafür auch jeder andere aminosäurehaltige, physiologische Puffer zu verwenden. Das Volumen an L.B. während des Markierungsprozesses wurde möglichst gering gehalten, andererseits wurde darauf geachtet, daß die DMSO- Konzentration 2%, kurzfristig bei dickeren Geweben 5% niemals überschritt.

8. Affinitätschromatographie von biotinylierten Membranproteinen an Avidin- Agarose

Eine Glas- Säule in Form einer Pasteur- Pipette wurde am unteren Ende mit einem Bausch aus silikonisierter Glaswolle verschlossen, mit 150 ul Gelbett- Volumen an Avidin- Agarose (SIGMA, München) gefüllt und nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Als Laufpuffer wurde eine Lösung von 0,2% Na-Desoxycholat in PBS ohne Calcium/ Magnesium pH 8,3 verwendet. Nach allen Wasch- oder Elutionsschritten mit Glycin- HCl pH 2,0 mußte die Säule zunächst mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gründlich gespült werden, da Desoxycholat im sauren pH- Bereich ausfällt. Für die Homogenisierung des markierten Materials wurde der Laufpuffer mit 10 ul/ml Aprotinin (SIGMA, München) und 20 ug/ml DNAse I (Boehringer, Mannheim) komplettiert.
Nach der Homogenisierung in reichlich Laufpuffer (das Volumen spielt ja bei einer Affinitätschromatographie keine Rolle) wurde vom Ungelösten abzentrifugiert, und der klare Überstand auf die Säule aufgepumpt. Das Beladen sowie Waschen und Elution der Säule erfolgten mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Vario- Perpex, LKB, Schweden) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,05 ml/min.
Die Säule wurde zunächst mit 20 Volumina Laufpuffer gewaschen, bevor mit der spezifischen Elution mit 1 mg/ml D- Biotin (SIGMA) (titriert mit Natronlauge) in Laufpuffer begonnen wurde. Die Elution von biotinylierten Proteinen wurde mit einem Dot- Blot- Verfahren verfolgt (s.u.). Nach Abschluß der spezifischen Elution mit D- Biotin (ca. 10 ml Elutionspuffer durchgepumpt) wurde die Säule mit 0,1 M Glycin- HCl pH 2 und 0,5 % NP 40 ein zweites Mal eluiert (insgesamt 3 ml von

diesem Elutionspuffer). Beide Eluate wurden schließlich in einem 10fachen Überschuß an eiskaltem Ethanol gefällt, abzentrifugiert, und der Niederschlag noch zweimal in 80% Ethanol in Wasser gewaschen.

9. Dot- Blot- Verfahren zur Überwachung der Säulen- Elution

1 ul- Aliquots von jeweils 350 ul Elutionsvolumen wurden auf einen Nitrocellulosefilterstreifen (BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetüpfelt. Der Filter wurde dann vorsichtig in PBS eingeweicht und für einige Stunden in eine 3-4 %ige Lösung von PVP in PBS eingelegt, bevor er eine Stunde lang mit Streptavidin- Peroxidase (Amersham, Braunschweig) 1:1000 in 0,3% PVP, 0,05% Tween 80 in PBS inkubiert wurde. Nach gründlichem Waschen in der gleichen Lösung wurde er schließlich mit 4-Cl-1-Naphtol und H_2O_2 wie üblich (siehe Boxberg, 1984) angefärbt.
Die Färbung läßt sich photometrisch auswerten (z.B. mit einem Densitometer Quick- Scan, Helena Lab., USA).

E) Membranvesikel

10. Präparative Fokussierung der Membran- Rohvesikel

Eine Glasröhre von 5 mm Durchmesser und 100 mm Länge wurde bis zur gewünschten Höhe mit folgender Gellösung gefüllt: 8,5 M Harnstoff (BRL,USA), 1% Ampholine (Servalyte, SERVA, Heidelberg) pH 3-10, 2% Ampholine pH 4-6, 2% Ampholine pH 5-8, 4,3% Acrylamid; dest. Wasser ad 100%. Die Polymerisation wurde durch Zugabe entsprechender Mengen Ammoniumperoxodisulfat und TEMED kurz vor dem Gießen des Gels gestartet. Die zu fraktionierenden Rohvesikel (siehe Kap.II) aus ca. 20 Tecta wurden in obiger Harnstoff- Ampholine- Lösung, jedoch ohne Acrylamid, suspendiert und 15 sec. lang mit Ultraschall homogenisiert (50 W; Labsonic 1510, Braun, Melsungen). Das Volumen der Vesikel- Lösung sollte sich nach dem Volumen des gelfreien Raumes in der Fokussierungs- Glasröhre richten (etwa 1,5 ml). Die letztere wurde vor dem Beschicken zunächst mit Vesikel-freier Harnstoff- Lösung gespült, dann wurde das Gel mit der Vesikel- Lösung überschichtet. Den Abschluß nach oben bildete eine 3-4 mm hohe Schicht von 1:1 in dest. Wasser verdünnter Harnstoff- Ampholine- Lösung (Overlay). Dann wurde die Glasröhre oben mit einer Kappe aus Filtergaze verschlossen und in eine handelsübliche Rundgel- Fokussierungsapparatur eingeschoben. Als Elektrodenpuffer dienten 10 mM Phosphorsäure und 20mM Natronlauge. Die Polung der Apparatur usw. richteten sich nach der Wahl von NEPHGE (Pluspol und Phosphorsäure oben) oder IEF (Minuspol und Natronlauge oben); ebenso sind Laufzeiten und Spannungsverlauf variabel.

Gestartet wurde die Fokussierung bei konstanter Spannung von 100 V. Während des Laufs fällt der Strom von anfänglich ca. 1 mA pro Gel auf etwa 30 uA ab.

Am Ende des Laufs wurden die "natürlichen" Lipid- Vesikel-Fraktionen sowie der Rest der "flüssigen Phase" mit einer silikonisierten Pasteur- Pipette entnommen. Die Lipid- Vesikel wurden für anschließende biologische Tests noch einmal in obiger Harnstoff- Lösung gewaschen, 1 Stunde lang zusammen mit einem silikonisierten Glasstäbchen (zwecks besonders intensiver Durchmischung) in einem Eppendorf- Gefäß auf dem Vortex geschüttelt und über Nacht gegen PBS in einer rotierenden Kammer dialysiert. Für eine gelelektrophoretische Analyse genügt dagegen einfaches Waschen und Abzentrifugieren.

11. Herstellung von Lecithin- Vesikeln aus der an Lipid-Vesikeln freien flüssigen Phase:

2 mg Lecithin (SIGMA, München) wurden in 0,5 ml Harnstoff-Lösung (s.o.) aufgenommen, 30 sec. lang ultrabeschallt (50 W, Labsonic 1510) und mit 1 ml der flüssigen Phase der Fokussierung gemischt. Die entstandene Suspension wurde wie oben (s. 10.) zusammen mit einem silikonisiertem Glasstäbchen 2 Stunden auf dem Vortex geschüttelt und schließlich über Nacht gegen PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} dialysiert. Die entstandenen Vesikel wurden in einer Eppendorf- Zentrifuge sedimentiert.

F) Allgemeines

12. **Silikonisierung von Glaswaren:** Glaswaren wie Pasteur-Pipetten wurden durch eine 2%ige Lösung von Dimethyl- dichlorsilan in Trichlorethylen (BDH, England) gezogen, kurz trocknen gelassen und dann für einige Sekunden in einer Flamme erhitzt. Vor der Verwendung wurden sie noch in Wasser gespült.

13. **PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+}**

für 1 l:		
	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,15 g
	$MgCl_2 x7H_2O$	0,1 g
	$CaCl_2 x2H_2O$	0,1 g

14. **Chemikalien:** Alle Chemikalien ohne Herkunftsangabe wurden von Merck, Darmstadt im höchsten, erhältlichen Reinheitsgrad bezogen, mit Ausnahme des ultrareinen Harnstoffs, der von BRL, USA, und der Elektrophorese- Chemikalien wie SDS, TEMED und Acrylamid, die von Bio- Rad, München, stammten.

15. **Geräte für die Licht- und Elektronenmikroskopie:** Für die Lichtmikroskopie wurde ein Fluoreszenzmikroskop von ZEISS (Oberkochen) mit aufgesetzter Kamera Olympus OM2 (Olympus, Japan) verwendet. Für die Mikro- Aufnahmen diente meist der HP5- Film (Ilford, England) bzw. AgfaPan 100 (Agfa, Leverkusen).
Ultradünnschnitte wurden auf einem Ultrotome 2128 (LKB, Schweden) angefertigt und in einem TEM 102 (Siemens) betrachtet.

G) Abkürzungen

DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellulärmatrix
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP.	Isoelektrischer Punkt
ips	Impulse pro Sekunde
L.B.	"labeling buffer" für die Biotin-Markierung
NEPHGE	Non- Equilibrium pH- Gradient Electrophoresis
PVP	Polyvinyl- Pyrrolidon
PBS	Phosphat- gepufferte Saline
RITC	Rhodamin- Isothiocyanat
SDS	Na- Dodecylsulfat
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	Tetraethyl- methyl- ethylendiamin
ZNS	Zentralnervensystem

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ansorge, W.: Fast Visualization of Protein Bands by Impregnation with Potassium Permanganate and Silver Nitrate. In: D. Stathakos (ed.),"Electrophoresis '82"; Walter de Gruyter, Berlin, New York (1982)

2. Ariens-Kappers, C.U.: Further contribution on neurobiotaxis. IX. The Dynamic Polarization of the Neuron. J.Comp.Neurol. 27, 261-298 (1917)

3. Barbera, A.J.: Adhesive Recognition between Developing Retinal Cells and the Optic Tecta of the Chick Embryo. Dev.Biol. 46, 167-191 (1975)

4. Bastiani, M.J., Doe, C.Q., Halford, S.L., Goodman, C.S.: Neuronal Specificity and Growth Cone Guidance in Grasshopper and Drosophila Embryos. Trends Neurosci. 8, 257-266 (1985)

5. Bayer, E.A., Zalis, M.G., Wilchek, M.: 3-(N-Maleimidopropionyl-)Biocytin: A Versatile Thiol-Specific Biotinylating Agent. Anal. Biochem. 149, 529-536 (1985)

6. Bonhoeffer, F., Huf, J.: Recognition of Cell Types by Axonal Growth Cones in vitro. Nature 288, 162-164 (1980)

7. Bonhoeffer, F., Gierer, A.: How do Retinal Axons Find their Targets on the Tectum? Trends Neurosci. 7, 378-381 (1984)

8. Bonhoeffer, F., Huf, J.: Position Dependent Properties of Retinal Axons and their Growth Cones.
Nature 315, 409-410 (1985).

9. Boxberg, Y. v.: Proteintransfer von ultradünnen Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose-Filter; Anwendung dieser Technik für Nachweis und Charakterisierung von adhäsiven Proteinen.
Diplomarbeit, Tübingen (1984)

10. Bray, D.: Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension.
Dev.Biol. 102, 379-389 (1984)

11. Buckland, R.M.: Strong Signals from Streptavidin-Biotin.
Nature 320, 557-558 (1986)

12. Cajal, S. Ramon y: Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonaire.
Anat.Ang. 5, 609-613 (1890)

13. Cajal, S. Ramon y: Alcunas observaciones favorables a la hipótesis neurotropica.
Trabajos Lab.Invest.Biol.Univ. Madrid 8, 63-134 (1910)

14. Changeux, J.P., Danchin, A.: Selective Stabilisation of Developing Synapses as a Mechanism for the Specification of Neuronal Networks.
Nature 264, 705-712 (1976)

15. Claviez, M.: Kultur embryonaler Hühnchen-Retina: Eigenschaften auswachsender Neuriten und ihre Wechselwirkung mit der Umgebung.
Dissertation, Tübingen (1981)

16. Fraser, S.C., Hunt, R.K.: Retinotectal Specificity: Models and Experiments in Search of a Mapping Function. Ann.Rev.Neurosci. 3, 319-553 (1980)

17. Fujisawa, H. Watanabe, K., Tani, N., Ibata, Y.: Retinotopic Analysis of Fiber Pathways in Amphibians. II. The Frog Rana nigromaculata Brain Res. 206, 21-26 (1981)

18. Gierer, A.: Development of Projections between Areas of the Nervous System. Biol.Cybern. 42, 69-78 (1981)

19. Green, N.M.: Avidin; 3.Nature of the Biotin-binding Site. Biochem.J. 89, 599-609 (1963)

20. Green, N.M., Konieczny, L., Tones, E.J., Valentina, R.C.: The Use of Bifunctional Biotinyl Compounds to Determine the Arrangement of Subunits in Avidin. Biochem.J. 125, 781-791 (1971)

21. Gunderson, R.W.: Sensory Neurite Growth Cone Guidance by Substrate Adsorbed Nerve Growth Factor. J.Neurosci.Res. 13, 199-212 (1985)

22. Halfter, W., Claviez, M., Schwarz, U.: Preferential Adhesion of Tectal Membranes to Anterior Embryonic Chick Retina Neurites. Nature 292, 67-70 (1981)

23. Halfter, W.: Explantate der embryonalen Vogel-Retina als in vitro-Modell zur axonalen Orientierung im entstehenden Zentralnervensystem der Vertebraten. Dissertation, Tübingen (1983)

24. Halfter, W., Deiss, S.: Axon Growth in Embryonic Chick and Quail Retinal Whole Mounts *in vitro*.
Dev.Biol. *102*, 344-355 (1984)

25. Halfter, W.: Anterograde Tracing of Retinal Axons in the Avian Embryo with Low Molecular Weight Derivatives of Biotin.
Dev.Biol. *119*, 322-335 (1987)

26. Harrison, R.G.: The Outgrowth of the Nerve Fiber as a Mode of Protoplasmic Movement.
J.Exp.Zool *9*, 787-846 (1910)

27. Henke-Fahle, S., Bonhoeffer, F.: Inhibition of Axonal Growth by a Monoclonal Antibody.
Nature *303*, 65-67 (1983)

28. His, W.: Über mechanische Grundvorgänge tierischer Formenbildung.
Arch.Anat.Physiol. Leipzig, 1-80 (1894)

29. Hurley, W.L., Finkelstein, E., Holst, B.D.: Identification of Surface Proteins on Bovine Leukocytes by a Biotin-Avidin Protein Blotting Technique.
J.Immunol.Meth. *85*, 195-202 (1985)

30. Kern- Veits, B.: Untersuchungen zur spezifischen Erkennung von Oberflächenkomponenten in Zellmembranen durch retinale Axone *in vitro*.
Dissertation, Tübingen (1985)

31. Köhler, G., Milstein, C.: Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity.
Nature *256*, 495-497 (1975)

32. Krayanek, S., Goldberg, S.: Oriented Extracellular Channels and Axonal Guidance in the Embryonic Chick Retina.
Dev. Biol. 84, 41-50 (1981)

33. Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)

34. Letourneau, P.C.: Possible Roles for Cell-to-Substratum Adhesion in Neuronal Morphogenesis.
Dev. Biol. 44, 77-91 (1975a)

35. Letourneau, P.C.: Cell-to-Substratum Adhesion and Guidance of Axonal Elongation.
Dev.Biol. 44, 92-101 (1975b)

36. Levi-Montalcini, R.V., Hamburger, V.: A Diffusible Agent of Mouse Sarcoma, Producing Hyperplasia of Sympathetic Ganglia and Hyperneurotization of Viscera in the Chick Embryo.
J.Exp.Zool. 123, 233-288 (1953)

37. Meißner, D.: Dreidimensionale Rekonstruktion frühembryonaler Nervenfasern in der Wachtelretina.
Dissertation, Tübingen (1987)

38. Merrell, R., Glaser, L.: Specific Recognition of Plasma Membranes by Embryonic Cells.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 2794-2798 (1973)

39. Neukirchen, R.O., Schlosshauer, B., Baars, S., Jäckle, H., Schwarz, U.: Two-dimensional Protein Analysis at High Resolution on Microscale.
J.Biol.Chem. 257, 15229-15234 (1982)

40. Nitkin, R.M., Wallace, B.G., Spira, M.E., Godfrey, E.W., McMahon, U.J.: Molelcular Components of Synaptic Basal Lamina that Direct Differentiation of Regenerating Neuromuscular Junctions.
Cold Spring Harbor Symposion 48, 653-665 (1983)

41. O'Farrell, P.H.: High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins.
J.Biol.Chem. 250, 4007-4021 (1975)

42. Orr, G.A.: The Use of the 2-Iminobiotin-Avidin Interaction for the Selective Retrieval of Labeled Plasma Membrane Components.
J.Biol.Chem. 256, 761-766 (1981)

43. Patel, N.B., Xie, Z.P., Young, S.H., Poo, M.M.: Response of Nerve Growth Cone to Focal Electric Currents.
J.Neurosci.Res. 13, 245-252 (1985)

44. Pinder, J.C., Phethean, J., Gratzer, W.B.: Spectrin in primitive Erythrocytes.
FEBS Letters 92, 278-282 (1978)

45. Purves, D.: Modulation of Neuronal Competition by Postsynaptic Geometry in Autonomic Ganglia.
Trends Neurosci. 1, 43-44 (1980)

46. Rager, G.: Specificity of Nerve Connections by Nonspecific Mechanisms.
Trends Neurosci. 1, 43-44 (1980)

47. Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Frank, R., Bonhoffer, F., Rutishauser, U.: Membrane Glycoproteins Involved in Neurite Fasciculation.
J.Cell Biol. 104 343-353 (1987)

48. Silver, J., Sidman, R.L.: A Mechanism for the Guidance and Topographic Patterning of Retinal Ganglion Cell Axons.
J.Comp.Neurol. 189, 101-111 (1980)

49. Sperry, R.W.: Visuomotor Coordination in the Newt (Triturus viridescens) after Regeneration of the Optic Nerves.
J.Comp.Neurol. 79, 33-555 (1943)

50. Sperry, R.W.: Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 50, 703-710 (1963)

51. Thanos, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Entwicklung und des Verlaufs retinotectaler Fasern im Hühner-Embryo.
Dissertation, Tübingen (1983).

52. Thanos, S., Bonhoeffer, F., Rutishauser, U.: Fiber-fiber Interaction and Tectal Cues Influence the Development of the Chick Retinotectal Projection.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 81, 1906-1910 (1984)

53. Towbin, H., Staehelin, Th., Gordon, J.: Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)

54. Updyke, T.V., Nicholson, G.L.: Immunoaffinity Isolation of Membrane Antigens with Biotinylated Monoclonal Antibodies and Immobilized Streptavidin Matrices. J.Immunol.Meth. 73, 83-95 (1984)

55. Weiss, P.: In vitro Experiments on the Factors Determining the Course of the Outgrowing Nerve Fiber. J.Exp.Zool. 68, 393-448 (1934)

56. Whitely, N.M., Berg, H.C.: Amidination of Outer and Inner Surfaces of the Human Erythrocyte Membrane. J.Mol.Biol. 87, 541-561 (1974)

57. Wilcheck, M., Ben-Hur, H., Bayer, E.A.: p-Diazobenzoyl-Biocytin. A New Biotinylating Reagent for the Labeling of Tyrosines and Histidines in Proteins. Biochem.Biophys.Res.Com. 138, 872-879 (1986)

DANK

Der gesamten Arbeitsgruppe und vielen anderen im Institut (auch wenn nicht alle namentlich erwähnt sind) möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und vor allem für eine Atmosphäre, in der Wissenschaft auch Freude machen kann (wenigstens manchmal).

Insbesondere sind zu nennen Prof. Dr. Uli Schwarz, dem ich neben der Überlassung des Arbeitsplatzes für manche gute Diskussion und oft auch mal ausgefallene Ideen dankbar bin sowie für seine für einen "Chef" nicht unbedingt selbstverständliche Toleranz gegenüber den Eigenheiten seiner Mitarbeiter.

Renate Wütz und Silvia Deiss haben mir sehr geholfen bei der Herstellung der Explantatkulturen und überhaupt durch die Einführung in so manche Technik, auf der meine Arbeit aufbaut. Stefan Kröger, Ludger Niehörster und (bis fast zuletzt) Mechthild Harders-Opolka danke ich für gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und ablenkende Diskussionen beim Mittagessen, ebenso Willi Halfter und Don Newgreen, die nun schon seit einem Jahr in der Arbeitsgruppe fehlen.

Bei der Reinschrift der Arbeit waren mir Ingrid Baxivanelis und Christiane Seeland-Wöhrle sehr behilflich. Der gesamte "Keller-Trakt" war am Gelingen meiner Arbeit beteiligt, sei es durch Hilfe bei der Elektronenmikroskopie (Inge Zimmermann, Jürgen Sauter und Regine Braun) oder durch die Anfertigung endloser 2D-Gel- Photographien (Roswitha Groemke-Lutz und Brigitte Sailer). Schließlich möchte ich noch unsere exzellente Werkstatt erwähnen, die für meine doch recht technisch orientierte Arbeit unentbehrlich war.

LEBENSLAUF

Am 3. September 1955 wurde ich in Dresden/DDR geboren als Sohn des kaufmännischen Angestellten Jobst-Heinrich v.Boxberg und der freiberuflichen Journalistin Katharina, geborene Herzfeld. 1956 kam ich nach Hamburg-Groß Borstel, wo ich ab 1961 für 3 Jahre die Volksschule besuchte, bevor ich an das Gymnasium "Gelehrtenschule des Johanneums" wechselte; dort legte ich Ende 1973 das Abitur ab. Nachdem ich zunächst zwischen 1974 und 1975 meinen Wehrdienst ableistete, wurde ich 1977 als Kriegsdienstverweigerer anerkannt.
Ab Wintersemester 1975/76 studierte ich an der Universität Tübingen Biochemie, was ich mit der mündlichen Diplomprüfung im Sommer 1982 beendete.
Seit dem Herbst 1982 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie Tübingen (früher: Institut für Virusforschung), wo ich unter der Leitung von Prof. Dr. Uli Schwarz zunächst meine Diplomarbeit, ab Juli 1984 dann meine Doktorarbeit anfertigte.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer
H. Bisswanger
V. Braun
K.G. Grell
H. Hagenmeyer
H. Mauser
D. Mecke
H. Metzner
H. Probst
U. Schwarz
G. Weitzel
U. Weser
A. Wendel

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45